

Aus der Andrologischen Abteilung  
der Universitäts-Hautklinik Gießen  
Leiter: Prof. Dr. W. Meyhöfer

---

Histologische, cytophotometrische und  
Fertilitätsuntersuchungen  
über den Einfluß von Procarbazin (Natulan®)  
auf Hoden und Nebenhoden der Maus

Heese, Klaus: Spermatogenese, Leydigzellen, Vaskularisation  
Strödter, Dietrich: Histone, Arginin  
Schreck, Rainer: Gesamtproteine, DNS

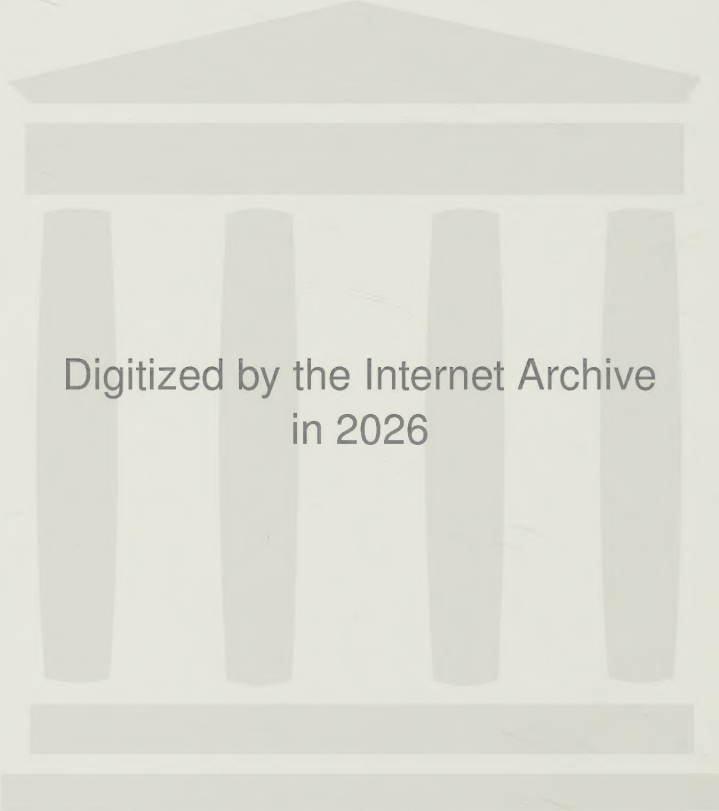
Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Bereichs Humanmedizin  
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Klaus Heese, Bad Wildungen  
Rainer Schreck, Heidelberg  
Dietrich Strödter, Kattowitz

Gießen 1972







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41545932\\_0040](https://archive.org/details/IA41545932_0040)

Aus der Andrologischen Abteilung  
der Universitäts-Hautklinik Gießen  
Leiter: Prof. Dr. W. Meyhöfer

---

Histologische, cytophotometrische und  
Fertilitätsuntersuchungen  
über den Einfluß von Procarbazin (Natulan®)  
auf Hoden und Nebenhoden der Maus

Heese, Klaus: Spermatogenese, Leydigzellen, Vaskularisation  
Strödter, Dietrich: Histone, Arginin  
Schreck, Rainer: Gesamtproteine, DNS

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Bereichs Humanmedizin  
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Klaus Heese, Bad Wildungen  
Rainer Schreck, Heidelberg  
Dietrich Strödter, Kattowitz

Gießen 1972



Dekan: Prof. Dr. Hj. Staudinger

Referent: Prof. Dr. W. Meyhöfer

Coreferent: Prof. Dr. J. Kracht

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                     | Seite    |
|-------------------------------------|----------|
| Einleitung                          | 1        |
| Wirkungsmechanismus von Procarbazin | 3        |
| Material und Methodik               |          |
| Tierversuch                         | 5        |
| Histologie                          | 9        |
| Cytophotometrie                     | 17       |
| Ergebnisse                          |          |
| Histologie                          | HEESE    |
| Spermatogenese                      | 19       |
| Leydigzellen                        | 33       |
| Vaskularisation                     | 35       |
| Cytophotometrie I                   | STRÖDTER |
| Fastgreen-Färbung                   | 38       |
| Sakaguchi-Färbung                   | 46       |
| Varianzanalysen                     | 55       |
| Cytophotometrie II                  | SCHRECK  |
| Naphthol-Yellow-Färbung             | 59       |
| Feulgen-Färbung                     | 64       |
| Varianzanalysen                     | 71       |
| Reproduktionsversuch                | 77       |
| Rel. Hodengewichte                  | 81       |

|                                                           | Seite    |
|-----------------------------------------------------------|----------|
| Besprechung und Diskussion                                |          |
| Histologie                                                | HEESE    |
| Grundlagen: Spermatogenese                                | 83       |
| Spermatogenese                                            | 85       |
| Leydigzellen                                              | 101      |
| Vaskularisation                                           | 109      |
| Cytophotometrie I                                         | STRÖDTER |
| Besprechung der Fastgreen-Färbung                         | 114      |
| Besprechung der Sakaguchi-Färbung                         | 119      |
| Diskussion der Fastgreen- und Sakaguchi-Färbung           | 125      |
| Cytophotometrie II                                        | SCHRECK  |
| Besprechung und Diskussion der<br>Naphthol-Yellow-Färbung | 131      |
| Besprechung und Diskussion der<br>Feulgen-Färbung         | 136      |
| Besprechung des Reproduktionsversuchs                     | 143      |
| Gesamtdiskussion                                          | 146      |
| Intertubuläre Stadienkoordination                         | HEESE    |
| Zusammenfassung                                           | 155      |
| Literatur                                                 | 159      |

## EINLEITUNG

Fertilitätsstörungen nach Zytostatikabehandlung sind ein häufig registrierter Befund. Im Tierversuch konnte eine initiale Infertilität (1. - 4. Woche) mit Sarcolysin, TEM, Thiotepa und verschiedenen Sulfonsäureestern erzeugt werden (Jackson 1964, Jackson et al. 1959, Jackson 1960, Fox et al. 1965, Cooper et al. 1970).

Verzögerte Infertilität dagegen wird nach der Applikation von Busulfan (ab 7. Woche), höher dosiertem Thiotepa und TEM beschrieben. (Jackson et al. 1959, Jackson 1960, Jackson et al. 1969, Fox et al. 1967).

Mit histologischen Methoden stellte man Spermatogenesehemmungen durch N - Lost, Äthionin, Äthylurea, Cyclophosphamid und Busulfan fest. Bei den beiden letzten Substanzen gelang es, als empfindliche Zellgenerationen die A- und Intermediärspermatogonien zu identifizieren (Goldeck et al. 1951, Fox et al. 1967, Hilscher et al. 1968, de Rooij et al. 1968, Partington et al. 1964).

Ein massiver Abfall der Samenzellzahl nach Methotrexatbehandlung wird von Meyhöfer (1970) beschrieben. Mit Hilfe der Cytophotometrie weist der Autor bei denselben Spermien einen Abfall der Feulgen - Anfärbbarkeit unter der Behandlung nach. Während signifikant verminderter Arginingehalt in diesen Spermien nachgewiesen werden konnte, waren die Histone unauffällig.

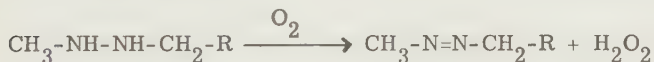
Zur Hodenwirksamkeit des in unserem Versuch verwendeten Procarbazins liegen verschiedene Veröffentlichungen vor. Fox und Fox berichten 1967 über eine 2 Wochen nach Applikation von Procarbazin aufgetretene irreversible Infertilität bei Ratten. Von Bollag und Theiss (1964) wurde neben einer auf Procarbazin zurückzuführenden Atrophie der Testes eine auffallende Depression der Spermatogenese festgestellt. Hilscher und Reichelt (1968) beschreiben eine hochgra-

dige Spermatogeneseschädigung mit Angriffspunkt im Bereich von A- bis Intermediärspermatogonien.

## WIRKUNGSMECHANISMUS VON PROCARBAZIN

Der Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine war Gegenstand vieler Untersuchungen. Diese Untersuchungen ergaben, daß Procarbazin per se nicht wirksam ist (Weitzel et al. 1968), beim Abbau des Pharmakons jedoch mehrere cytostatisch wirksame Komponenten entstehen, deren tumorhemmende Wirkung in vitro und vivo an verschiedenen Tiertumoren nachgewiesen werden konnte (Hirschmann et al. 1969, Weitzel et al. 1967 a u. 1967 b, 1968).

Die Methylhydrazine autoxydieren in Lösung leicht unter Bildung von  $H_2O_2$  (Zeller et al. 1963, Weitzel et al. 1964) zu der entsprechenden Azo-Verbindung.

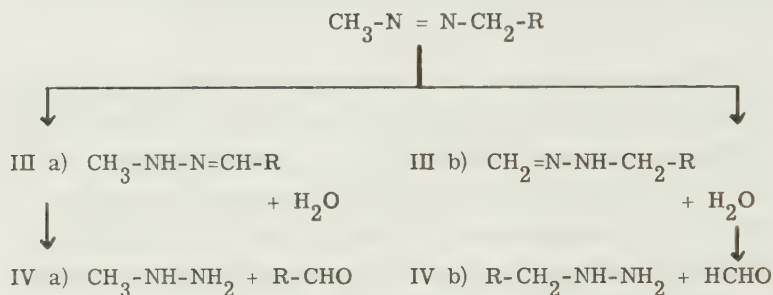


Verschiedene Autoren vermuteten daher (Zeller et al. 1963, Bollag et al. 1963, Rutishauser et al. 1963, Berneis et al. 1963), daß der cytostatische Effekt auf dem bei dieser Dehydrierung entstehenden  $H_2O_2$  beruht, was direkt oder indirekt zu DNS-Schädigungen führen sollte.

Weitzel et al. (1968) gelang es nachzuweisen, daß  $H_2O_2$  durch Hemmung der DNS-Polymerase und der DNS-abhängigen RNS-Polymerase wirkt.

Mit der Entstehung der zur Isomerisierung neigenden Azoverbindung wird die Bildung zahlreicher Abbauprodukte mit cytostatischen Eigenschaften eingeleitet.

(nach Weitzel et al. 1968)



Die beiden möglichen Isomerisationsprodukte der Azoverbindung führen nach Hydrolyse in beiden Fällen zu nachgewiesenen Aldehyden (Weitzel et al. 1968) 4-Formyl - N - Isopropylbenzamid (IV a) und Formaldehyd (IV b).

Formaldehyd - ansonsten wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkend - hemmt zusätzlich die Bildung von Nucleosidtriphosphaten (Weitzel et al. 1968).

4 - Formyl - N - Isopropylbenzamid hemmt den Einbau von Uridin, den Eintritt von Nucleosiden und Purinbasen in die Zelle sowie den Leucin-Einbau durch Bildung Schiff'scher Basen. Durch den letzten Angriffspunkt wird Leucin der Proteinsynthese entzogen (Weitzel et al. 1967 a, 1967 b, 1968).

Formaldehyd (III b), ein Azomethinderivat, verhält sich wie Formaldehyd gegenüber RNS- und DNS-Polymerase und greift darüber hinaus die DNS direkt an (Weitzel et al. 1968). "Die Gesamtheit dieser Einzeleffekte dürfte den Stoffwechsel von Tumorzellen so stark beeinträchtigen, daß die durch Procarbazin (Natulan) ausgelösten Wachstumshemmungen damit hinreichend erklärbar sind" (Weitzel et al. 1968).

## MATERIAL UND METHODIK

### TIERVERSUCH

#### 1. Tiermaterial und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten Mäuse vom Inzuchtsstamm NMRI, die bei Versuchsbeginn  $79 \pm 2$  Tage alt waren und ein Durchschnittsgewicht von 34,32 g hatten. Sie wurden mit nummerierten Metallmarken am linken Ohr gekennzeichnet und in Gruppen bis zu 12 Tieren in Makrolonkäfige (Typ III) (Jung) gesetzt. Diese Käfige wurden zweimal wöchentlich gereinigt, gewechselt, desinfiziert und mit Hobelspänen frisch eingestreut. Die Tiere erhielten täglich frisches Wasser und Futter. Die Stalltemperatur betrug konstant 20 - 25° C.

#### 2. Versuchsplan

102 männliche Tiere wurden in 3 Behandlungsreihen eingeteilt, von denen jede Reihe selbst aus einer Gruppe für die histologisch cytophotometrischen Untersuchungen und einer Gruppe für den Reproduktionsversuch bestand. 84 Weibchen wurden so aufgeteilt, daß für jeden Mäusebock der Reproduktionsgruppen jeweils 2 Tiere für die Paarung zur Verfügung standen. Alle männlichen Tiere erhielten in 48 h-Abständen fünf Injektionen Procarbazin - bzw. Kochsalzlösung. Entsprechend dem Entnahmeschema (Tab. 1) wurden in 8 - Tages - Abständen die für den histologisch-cytophotometrischen Teil vorgesehenen Tiere getötet und die für den Reproduktionsversuch vorgesehenen Tiere gepaart.

| Tage nach<br>Behandlungsbeginn | 10 | 18 | 26 | 34 | 42 | 50 | 58 | 66 | 74 | 82 |
|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| <hr/>                          |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Kontrolle                      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Histologie                     | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |
| Cytophotometrie                |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1.Reproduktion                 | 2  | -  | 2  | -  | 2  | -  | 2  | -  | 2  | -  |
| <hr/>                          |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 3, 3 TE                        |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Histologie                     | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |
| Cytophotometrie                |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1.Reproduktion                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | -  | 3  | -  | 3  | -  |
| <hr/>                          |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 10, 0 TE                       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Histologie                     | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |
| Cytophotometrie                |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1.Reproduktion                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | -  | 3  | -  | 3  | -  |
| <hr/>                          |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Tab. 1: Entnahmeschema der 102 männlichen Versuchstiere  
für die 3 Behandlungsreihen

### 3. Applikation

In Anlehnung an einen Vorschlag von Druckrey et al. (1963) wurde das Cytostatikum in therapeutischen Einheiten (TE) dosiert.

Definition: 1 TE = 1 % der LD<sub>50</sub>

Die LD<sub>50</sub> beträgt nach Angaben der Firma Hoffmann-La Roche AG Basel für Procarbazin 580 mg / kg.

$$1 \text{ TE} = 5,8 \text{ mg / kg} = 5,8 \times 10^{-3} \text{ mg / g.}$$

Die 3 Versuchsreihen behandelten wir wie folgt:

1. Reihe: 3,3 TE Procarbazin ( $= 19,14 \times 10^{-3} \text{ mg / g}$ )
2. Reihe: 10 TE Procarbazin ( $= 58,00 \times 10^{-3} \text{ mg / g}$ )
3. Reihe: Kontrolle 0,9 % Na Cl - Lösung (physiol.)

Die Procarbazinkonzentrationen der Lösungen wurden so gewählt, daß alle Tiere gleichen Gewichts auch gleiche Injektionsvolumina appliziert bekamen, d. h. daß Proportionalität zwischen Körpergewicht und Injektionsvolumen hergestellt werden konnte. Mäuseböcke gleichen Gewichts bekamen gleiche Injektionsmengen bzw. -volumina. Dabei wurde für ein Tier von 50 g Körpergewicht eine Injektionslösung von 1 ml festgelegt. Dieses Prinzip galt auch für die zu injizierenden Na Cl - Mengen bei der Kontrollreihe.

Die Behandlungsdauer entsprach mit 8 Tagen annähernd der Dauer des Spermatogenesezyklus der Maus (8,62 bzw. 8,63 Tage nach Oakberg 1956 b und Clermont und Trott 1969).

Vor der Injektion wurden die Tiere gewogen und das entsprechende Injektionsvolumen mit einer sterilen Tuberkulinspritze i. p. appliziert. Die Lösung wurde im Wasserbad auf einer konstanten Temperatur von 40<sup>0</sup> C gehalten. Procarbazin bzw. physiologische Na Cl - Lösung wurde 5 x im Abstand von je 2 Tagen injiziert.

#### 4. Entnahmezeiten

Die 1. Entnahme der histologisch / cytophotometrischen Gruppe erfolgte am 10. Tag nach Behandlungsbeginn - alle weiteren (wiederum in Anlehnung an den Spermatogenesezyklus) in 8 - Tagesabständen (s. Tab. 1). Entnahmezeiten und -mengen der Reproduktionsgruppen sind Tab. 1 zu entnehmen. Die Böcke wurden mit unbehandelten, dem weiblichen Zyklus nach kurz vor der Brunst stehenden Weibchen zur ersten Reproduktion zusammengesetzt. Für jedes Paar verwendeten wir kleinere Makrolonkäfige vom Typ II (Jung). Dieselben Böcke wurden 8 Tage später mit einem anderen Weibchen zur 2. Reproduktion zusammengebracht (modifiziertes "serial mating").

## 5. Zyklusbestimmung des Mäuseweibchens

Nach Thiery und Jung kann man den Zyklus der weiblichen Maus in 4 Hauptphasen einteilen:

|               | Dauer<br>(Thiery)  | Dauer<br>(Jung)  |
|---------------|--------------------|------------------|
| 1) Dioestrus  | 1 - 3 Tage         | 50 - 60 Std.     |
| 2) Prooestrus | <sup>+</sup> 1 Tag | 12 Std.          |
| 3) Oestrus    | 1 - 2 Tage         | 10 - 18 Std.     |
| 4) Metoestrus | 10 Std. - 2 Tage   | 24 - 30 Std.     |
| <hr/>         |                    |                  |
| Gesamtdauer   | 4 - 6 Tage         | 2 - 9 (Ø 5) Tage |

Da eine Paarung nur im Oestrus stattfindet, wurden von uns im Prooestrus stehende Tiere ausgewählt, um sicherzustellen, daß das weibliche Tier während der Paarungszeit mindestens 1 x das Oestrusstadium erreicht.

Zur Technik sei gesagt, daß zu diesem Zweck eine Vaginalspülung durchgeführt wurde. Das Material wurde auf einen Objektträger gesetzt und im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Folgende Kriterien grenzen den Prooestrus gegen den Oestrus ab (Thiery, Jung).

|            |     | Thiery |                 |                 | Jung                         |
|------------|-----|--------|-----------------|-----------------|------------------------------|
|            |     | Leu %  | kh. E. %        | Sok.            |                              |
| Prooestrus | I   | 80-90  | 10-20           | --              | Gequollene                   |
|            | II  | 10-80  | 20-80           | <sup>+</sup> 10 | kernh. Zellen,               |
|            | III | 0-10   | 45-50           | 40-50           | Leukoz. Ø                    |
| Oestrus    | I   | --     | <sup>+</sup> 10 | 90              | verhornte                    |
|            | II  | --     | --              | 100             | Zellen o. Kern<br>"Schollen" |

Leu% = polymorphkernige Leukozyten in Gesamt - %  
 kh. E. = kernhaltige Epithelzellen  
 SoK. = Schilferzellen ohne Kern = "Schollen"

Wir unterstellten einen 4 - täglichen Zyklus (was sich durch unsere mehr als 400 Zyklusbestimmungen als richtige Annahme erwies) und suchten 3 Tage vor jeweiligem Reproduktionsbeginn im Oestrus befindliche Weibchen aus; durch eine 2. Bestimmung am Reproduktionstag wurde sichergestellt, daß diese Tiere sich im Prooestrus befanden.

## 6. Präparatgewinnung, Ausstreichtechnik, Fixation

Die Tiere wurden in einem Deckelglas mit Hilfe von Äther pro narcosi in Überdosis getötet. Nach Abpräparierung von Hoden und Nebenhodenkopf wurde nach sofortiger Gewichtsbestimmung des linken Hodens auf einer Analysenwaage die beiden Organe getrennt auf jeweils 4 reinweiße Objektträger ausgestrichen. Wir ließen das Material 30 Sekunden antrocknen und fixierten dann die Hoden- und Nebenhodenkopfpräparate 20 Minuten lang in getrennten Methanol - Eisessig - Formalin - Bädern (MEF 85:5:10) (Bosse und Meyhöfer 1969). Der rechte Hoden wurde für die histologische Aufbereitung vorgesehen.

## HISTOLOGIE

### 1. Histologische Aufbereitung:

Der rechte Hoden jedes Tieres wurde sofort nach Entnahme in MEF fixiert. Die Einbettung erfolgte in Paraffin. Von jedem Hoden wurden drei 5  $\mu$  dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Schnittrichtung wechselte von Hoden zu Hoden zufällig. Die Färbung erfolgte mit PAS und HE-Gegenfärbung.

Der histologisch-technisch beste Schnitt jedes Hodens wurde ausgewählt und für sämtliche Untersuchungen vorgesehen. Er wurde bei 80-facher Vergrößerung in einzelnen Abschnitten fotografiert und

aus den Bildern als Fotomontage (Abb. 1) zusammengesetzt.



Abb. 1:  
Fotomontage  
eines Hoden-  
schnitts

Auf diesen Fotomontagen erfolgte die Einteilung der Tubuli contorti in quergeschnittene (größter Durchmesser bis zu 50 % größer als kleinster Durchmesser), schräggeschnittene (größter Durchmesser über 50 % und bis zu 200 % größer) und längsgeschnittene Tubuli (größter Durchmesser über 200 % größer). Alle Tubuli wurden innerhalb ihrer Gruppen fortlaufend nummeriert (quergeschnittene mit schwarzer, schräggeschnittene mit roter, längsgeschnittene mit weißer Tusche), so daß jeder Tubulus einzeln zu identifizieren war. Diese Einteilung wurde korrigiert, wenn die Messung der Tubulusdurchmesser am Präparat das notwendig machte.

## 2. Spermatogenese:

Auf jeder Fotomontage wurden 25 Tubuli ausschließlich nach folgenden Kriterien ausgewählt: 1. Sie mußten quergeschnitten sein.

2. Sie sollten möglichst in Linie nebeneinander lokalisiert sein.

3. Sie sollten nicht in einem Komplex beieinander liegen.

Die Kriterien 2 und 3 konnten bei geringer Anzahl von quergeschnittenen Tubuli eines Präparates nicht immer eingehalten werden.

Mit einem Schraubenmikrometer wurden bei 240-facher Vergrößerung die größten und kleinsten Durchmesser dieser 25 Tubuli jedes Tieres gemessen. Die Mittelwerte der kleinsten Tubulusdurchmesser wurden statistisch durch eine Varianzanalyse mit den Faktoren Zeit, Tier und Behandlung sowie anschließenden Scheffé-Tests zur Signifikanzprüfung zwischen den Behandlungsreihen an den einzelnen Entnahmetagen und zwischen den Entnahmetagen innerhalb der Reihen ausgewertet.

Die Tubuluswand wurde mit demselben Schraubenmikrometer bei 1500-facher Vergrößerung an zwei verschiedenen Stellen jedes Tubulus gemessen. Diese Stellen wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgesucht: 1. Sie durften nicht an benachbarte Tubuli angrenzen. 2. Sie sollten möglichst scharf gegen Keimepithel und Zwischengewebe abgrenzbar sein. 3. Sie sollten nicht ungewöhnlich dick oder dünn sein. Zur statistischen Prüfung wurde wieder eine Varianzanalyse mit denselben Faktoren und Scheffé-Tests mit derselben Zielsetzung durchgeführt.

Das Spermatogenesestadium dieser Tubuli wurde nach den von Oakberg (1956a) angegebenen Merkmalen bestimmt (vgl. Abschnitt "Grundlagen: Spermatogenese"). Wenn in einem Tubulusquerschnitt zwei Stadien auftraten, wurde in der Auswertung nur das überwiegende Stadium berücksichtigt. War der Anteil beider Stadien gleich groß, wurde keines mitgezählt. In der Kontrollreihe wurde die Zahl

der Tubuli, deren Stadium zu bestimmen war, von 25 auf durchschnittlich 38 je Tier erhöht, um für den Abschnitt "intertubuläre Stadienkoordination" zuverlässigere Werte zu erhalten.

Im nächsten Arbeitsgang wurde jeder Hodenschnitt vollständig nach Spermatogenesedefekten abgesucht. Als Schädigungsformen wurden die im Protokoll über die Tagung des Andrologischen Clubs am 2./3. März 1970 in Gießen angegebenen Defekte aufgenommen und durch weitere Formen ergänzt, die sich durch hohe Spezifität auszeichneten und mit den bisherigen Begriffen nicht faßbar waren. Dabei wurde unterschieden in:

1. einzelne Lücken (Fehlen einer oder weniger Zellen, die ausgestanzt wirkende Lücken im Keimepithel hinterlassen)
2. geringe oder starke Hemmung (alle Keimzellgenerationen sind mehr oder weniger stark vermindert)
3. Stop in Höhe einer bestimmten Zellgeneration (benannt nach der am weitesten ausdifferenzierten Zellgeneration)
  - a) inkomplett (der Tubulus ist nur zum Teil betroffen)
  - b) komplett (der Tubulus ist vollständig betroffen)
4. Mangel einer bestimmten Zellgeneration (Verminderung oder Fehlen der Zellen einer Generation bei Vorhandensein aller übrigen)
5. Sertoli cell only-Befund (kein Keimepithel, nur Sertolizellen vorhanden)
6. Kombinationen (mehrere Defekte in einem Tubulus).

Dieses Einteilungsschema wurde auf den einzelnen Tubulus unabhängig von seiner Schnittrichtung angewendet. Für jede Kategorie wurde die Anzahl der entsprechend geschädigten Tubuli durch lückenloses Absuchen jedes Präparats in parallelen Streifen erfaßt. Die Anzahl der ungeschädigten Tubuli wurde als Differenz zur Gesamtzahl (auf den Fotomontagen ausgezählt) bestimmt.

Danach wurde das Schädigungsbild einzelner, aber repräsentativer

Tubuli in den Stadien VII-VIII, X, XII, III und V untersucht. Diese Stadien haben den Vorteil, daß in ihnen keine Teilungen der Spermatogonien (Spg) vorkommen. In jedem Präparat sollten für jedes der fünf Stadien zwei quergeschnittene Tubuli zufällig ausgewählt werden.

Die vorhandenen Zellen wurden in jedem Tubulus nach Zellgenerationen getrennt gezählt. Alle A-Spg wurden stadiumentsprechend als A<sub>1</sub>-, A<sub>2</sub>- oder A<sub>3</sub>-Spg registriert. A<sub>0</sub>- oder A<sub>s</sub>-Spg sind dabei nicht gesondert erfaßt worden. Degenerativ oder nekrotisch veränderte Zellen wurden getrennt nach ihrer vermutlichen Zugehörigkeit zu Spg, Spermatozyten (Spz) oder Spermatiden (Spt) gezählt.

Die Kontrollreihe und die 10,0 TE-Reihe wurden auf diese Weise vom 1. bis zum 6., die 3,3 TE-Reihe vom 1. bis zum 3. Entnahmetag erfaßt.

Mangel an quergeschnittenen Tubuli und Fehlen von runden Spt am 2. Entnahmetag zwangen zu Abweichungen von diesem Plan. Mehrfach konnte bei einem Tier nur ein Tubulus in einem bestimmten Stadium gefunden werden, so daß vom zweiten Tier derselben Reihe und desselben Entnahmetages drei Tubuli untersucht werden mußten. Siebenmal wurde, weil auch beim zweiten Tier nicht genügend Tubuli eines Stadiums ausgemacht werden konnten, ersatzweise in längsgeschnittenen Tubuli ein Bereich über 11 Sertolizellen ausgezählt. (Die Anzahl der Sertolizellen kann als Parameter für die Tubulusgröße gelten. Ihr Gesamtdurchschnitt lag in der Kontrollreihe bei 11,1 je quergeschnittenen Tubulus.) Die auf diese Weise ermittelten Werte lagen sämtlich im Bereich der entsprechenden Zahlen der quergeschnittenen Tubuli. Am 2. Entnahmetag konnten in der 10,0 TE-Reihe in den Stadien XII und III nur drei und im Stadium V nur zwei quergeschnittene Tubuli, auf denen hier die Tagesdurchschnitte beruhen, identifiziert werden.

Der statistische Vergleich der beiden procarbacin-behandelten Rei-

hen mit der Kontrollreihe erfolgte getrennt für die einzelnen Zellgenerationen innerhalb ihrer Stadien und Entnahmetag mit dem  $\chi^2$ -Test. (Als erwarteter Wert wurde dabei jeweils der Mittelwert aus behandelter und unbehandelter Reihe angesehen.)

Weil in Stadium VII-VIII bei Kontroll- und 10,0 TE-Reihe der Versuchsplan streng eingehalten werden konnte, war es möglich, die Unterschiede in den Zellgenerationen dieses Stadiums bei diesen beiden Reihen durch Varianzanalysen mit den Faktoren Zeit, Tubulus, Tier und Behandlung zu untersuchen. Die Signifikanzprüfung zwischen den Reihen innerhalb der sechs Entnahmetage und zwischen den Entnahmetagen innerhalb der Reihen erfolgte mit Hilfe des Scheffé-Tests.

Die Erfassung morphologischer Veränderungen erfolgte durch lückenloses Absuchen aller Präparate nach gehäuft auftretenden Degenerationen und Nekrosen, nach Riesenzellen und möglichen anderen abnormen Erscheinungen. Alle betroffenen Tubuli wurden vermerkt.

### 3. Leydigzellen:

Der Leydigzellflächenanteil wurde in allen Reihen und an allen Entnahmetagen mit einem Integrationsokular gemessen, bei dem 25 Punkte derart auf parallelen Geraden verteilt waren, daß benachbarte Punkte jeweils gleiche Abstände zueinander hatten. Bei dieser Methode entspricht der Anteil der über Leydigzellen projizierten Punkte an der Gesamtzahl dem relativen Flächenanteil der Leydigzellen an der Gesamtfläche des Hodenparenchyms.

In jedem Präparat wurde bei Vergrößerung x256 von insgesamt 500 Punkten der Anteil der über Leydigzellen liegenden ausgezählt. Da einerseits alle Punkte über Hodengewebe liegen sollten, andererseits aber in den meisten Präparaten optisch leere Spalträume auftraten, wurde die Zahl von 500 in der Regel nicht mit 20 Gesichts-

feldern erreicht, so daß die ursprünglich auf optisch leere Räume projizierten Punkte im 21. Gesichtsfeld nachgezählt wurden.

Die Präparate wurden auf dem Kreutztisch in Mäanderlinien derart verschoben, daß keine Überschneidungen der Gesichtsfelder vorkamen. Die Tunica albuginea wurde nicht miterfaßt.

Die Leydigzellgröße wurde bei 400-facher Vergrößerung in allen Reihen für die ersten sieben Entnahmetage untersucht. Dazu war das Integrationsokular so zu verwenden, daß die Linie von einem bis zum übernächsten Markierungspunkt über lückenlose Komplexe von ausschließlich Leydigzellen eingestellt wurde. Diese Linie entsprach auf dem Hodenschnitt einer Strecke von konstant 116  $\mu$ . Sie wurde je Präparat über 10 verschiedene Leydigzellkomplexe gelegt, und alle von ihr geschnittenen Leydigzellen wurden gezählt.

Wenn diese Methode auch nicht in der Lage ist, präzise Zelldurchmesser zu ermitteln, weil nicht nur zentral geschnittene Zellen gezählt werden, so reicht sie dennoch zur Beurteilung von Größenunterschieden aus.

Sowohl mit den Daten zum Leydigzellflächenanteil als auch denen zur Leydigzellgröße wurde eine Varianzanalyse mit den Faktoren Zeit, Tier und Behandlung sowie anschließenden Scheffé-Tests zum Vergleich der Reihen und zur Verlaufskontrolle in den Reihen durchgeführt.

Die Häufigkeit der als degenerativ interpretierten Leydigzellen wurde in der Kontrollreihe und der 10,0 TE-Reihe dadurch halbquantitativ erfaßt, daß bei jedem Präparat ein Vermerk ("sehr wenige" - "einige" - "zahlreich") gemacht wurde.

#### 4. Vaskularisation:

Die Anzahl der Blutgefäße wurde in allen Reihen und an allen Entnahmetagen bei 202-facher und 512-facher Vergrößerung bestimmt,

ohne dabei nach Gefäßarten zu unterscheiden. Bei 202-facher Vergrößerung wurden alle Blutgefäße in 8 und bei 512-facher alle Blutgefäße in 16 rechteckigen Fotogesichtsfeldern je Präparat ausgezählt. Durch Verschiebung der Präparate auf dem Kreutztisch in Mäanderlinien präzise in Richtung der Längsachse oder der Querachse des rechteckigen Gesichtsfeldes war es möglich, die einzelnen, auszuzählenden Gesichtsfelder unmittelbar nebeneinander zu legen, ohne daß Überschneidungen vorkamen. Diese Technik machte es erforderlich, daß von den Gefäßen, die die Grenzen der Gesichtsfelder überschritten, nur die am oberen und rechten Gesichtsfeldrand mitgezählt wurden. Die Tunica albuginea blieb auch hier außerhalb der untersuchten Schnittfläche.

Die Messung der Längs- und Querdurchmesser der Gesichtsfelder bei beiden Vergrößerungen mit einer 1/100 mm-Strichplatte eröffnete die Möglichkeit, die untersuchte Fläche je Gesichtsfeld zu bestimmen und damit die gefundenen Blutgefäßzahlen für beide Vergrößerungen auf  $1 \text{ mm}^2$  zu beziehen und sie so direkt vergleichbar zu machen.

Der Einfluß des Wechsels von 202-facher zu 512-facher Vergrößerung auf die je Flächeneinheit zu beobachtende Blutgefäßanzahl wird durch den Faktor F quantifiziert. F wurde innerhalb der Reihen als Quotient aus den Tages- oder Gesamtdurchschnitten bei 512-facher und den entsprechenden Durchschnitten bei 202-facher Vergrößerung ermittelt.

Die statistische Prüfung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse mit den Einflußgrößen Zeit, Tier, Vergrößerung und Behandlung sowie anschließenden Scheffé-Tests zum Vergleich der Reihen und zur Verlaufskontrolle.

## CYTOPHOTOMETRIE

Nach Versuchsende erfolgte die Färbung sämtlicher zusammengehörender Hoden - und Nebenhodenpräparate in einem Färbebad pro Färbung. Insgesamt wurden 4 Färbungen angewandt.

### 1. Fastgreen-Färbung nach Alfert und Geschwind (1953) bei pH 8,2

- a) 15 Min. Behandlung in 5 %-iger Trichloressigsäure (TCA)
- b) Dreimaliges Waschen jeweils 10 Min. in 70 %-igem Alkohol, dazwischen jeweils Spülung mit aqua dest.
- c) 30 Min. Färbung in 0,1 %-iger wässriger Fastgreen-Lösung bei pH 8,2
- d) 5 Min. Auswaschen in Michaelispuffer
- e) 3 Min. Behandlung mit 96 %-igem Alkohol.

### 2. Sakaguchi-Färbung

- a) Kurze Eingabe in aqua dest. abtrocknen
- b) 10 Min. Lagerung in einer Mischung aus 4 %-iger Bariumhydroxid-, 1 %-iger Natriumhypochlorid- und 1,5 %-iger 2,4 Dichloro- - Naphthol - Lösung
- c) Dreimaliges Spülen in 5 %-igem Tri-n-Butylamin in tertiärem Butanol (5, 30, 30 Sek.)
- d) Zweimal 30 Sek. in 5 %-igem Tri-n-Butylamin in Xylol spülen.

### 3. Naphthol-Yellow-Färbung (Deitch 1955)

- a) 15 Min. Einbringen in 1 %-ige Lösung von Naphthol-Yellow S in 1 %-iger Essigsäure
- b) Kurzes Abspülen in 1 %-iger Essigsäure

- c) Abspülen mit aqua dest.
- d) 5 Min. entwässern in tertiärem Butanol

#### 4. Nuclealfärbung nach Feulgen

- a) 12 Min. Hydrolyse in 1n HCl bei 60° C
- b) Abbrechen der Hydrolyse durch Einbringen in H<sub>2</sub>O
- c) 2 Std. Lagerung in Schiff'schem Reagenz
- d) Dreimaliges Auswaschen, jeweils 2 Min. in SO<sub>2</sub>-Wasser
- e) Auswaschen in fließendem Wasser für 5 - 10 Min.

#### 5. Cytophotometrische Auswertung

Nach Aufsetzen eines Deckgläschens mittels des Spezialklebers "Eukitt" wurde jeweils 1 Tropfen Immersionsglycerin mit angeglichenem Brechungsindex  $n_D = 1,455$  (20° C) der Firma Zeiss auf die Ausstrichpräparate getropft und anschließend der cytophotometrischen Auswertung unterzogen. Diese erfolgte an 2 integrierenden Mikrodensitometern von Deely (Gerät I: Fastgreen - und Sakaguchi - Färbung, Gerät II: Feulgen - und Naphthol-Yellow-Färbung). Gemessen wurden nur Spermatozoen, die eindeutig als solche erkennbar und nicht von Verunreinigungen umgeben waren.

Die Präparate wurden bei folgenden Wellenlängen gemessen:

- |                         |            |
|-------------------------|------------|
| a) Fastgreen - Färbung  | l = 635 nm |
| b) Sakaguchi - Färbung  | l = 510 nm |
| c) Naphthol-Yellow-Fbg. | l = 435 nm |
| d) Feulgen - Färbung    | l = 570 nm |

Die Geräte zeigen die gemessenen Werte in Arbeits-Einheiten (AE) als Maß für das Integral der relativen Extinktion über die Fläche an.

## ERGEBNISSE

### HISTOLOGIE

#### Spermatogenese:

Die quantitative Erfassung der verschiedenen Spermatogenesezellen je quergeschnittenen Tubulus in den Stadien VII-VIII, X, XII, III und V führte zu den in den Tabellen 2, 3, 4a und 4b zusammengestellten Ergebnissen.

Da die Tagesdurchschnitte der Kontrollreihe im Verlauf dieser sechs Entnahmetage in verhältnismäßig engen Grenzen schwankten - die Abweichungen vom Gesamtdurchschnitt blieben immer unter 30 % - und dabei keinerlei zeitliche Regelmäßigkeit erkennen ließen, wurden sie zu den in Tab. 2 wiedergegebenen Gesamtdurchschnitten zusammengefaßt, um damit präzisere Vergleichsdaten für die procarbacin-behandelten Reihen zu erhalten.

|                     | Stadien  |        |        |        |        |
|---------------------|----------|--------|--------|--------|--------|
|                     | VII-VIII | X      | XII    | III    | V      |
| Sertoliz.           | 11,25    | 11,17  | 10,46  | 11,21  | 11,08  |
| A <sub>1</sub> -Spg | 2,88     | ---    | ---    | 2,63   | 2,33   |
| A <sub>2</sub> -Spg | ---      | 5,04   | ---    | ---    | ---    |
| A <sub>3</sub> -Spg | ---      | ---    | 7,67   | ---    | ---    |
| Im-Spg              | ---      | ---    | ---    | 13,79  | ---    |
| B-Spg               | ---      | ---    | ---    | ---    | 27,79  |
| Spz I               | 48,50    | 47,88  | 48,46  | ---    | ---    |
| Spz II              | 57,13    | 65,71  | 39,83  | 53,33  | 59,29  |
| runde Spt           | 151,50   | ---    | 44,21  | 148,88 | 149,83 |
| elong. Spt          | 108,92   | 154,63 | 134,13 | 119,29 | 119,67 |

Tab. 2: Gesamtdurchschnitte der Zellen des Tubulusepithels vom ersten bis sechsten Entnahmetag in der Kontrollreihe

Auf diese Gesamtdurchschnitte sind die in % angegebenen Tageswerte der 3,3 TE- und 10,0 TE-Reihe bezogen.

|                                 | Stadien            |                    |       |       |                    |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|--------------------|
|                                 | VII-VIII           | X                  | XII   | III   | V                  |
| 10 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |       |       |                    |
| Sertoliz.                       | 93,3               | 98,5               | 112,4 | 91,5  | 97,0               |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 95,7               | ---                | ---   | 76,2  | 96,4               |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 84,3               | ---   | ---   | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 81,5  | ---   | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---   | 63,5  | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---   | ---   | 86,4               |
| Spz I                           | 79,9               | 81,5               | 108,3 | ---   | ---                |
| Spz II                          | 111,6              | 94,7               | 95,4  | 97,5  | 84,8               |
| runde Spt                       | 126,2              | ---                | 83,1  | 99,1  | 109,8              |
| elong. Spt                      | 92,7               | 97,5               | 133,8 | 113,2 | 114,1              |
| 18 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |       |       |                    |
| Sertoliz.                       | 95,6               | 98,5               | 100,4 | 93,7  | 108,3              |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 113,0              | ---                | ---   | 95,2  | 117,9              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 89,3               | ---   | ---   | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 88,1  | ---   | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---   | 97,9  | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---   | ---   | 96,3               |
| Spz I                           | 99,5               | 29,2 <sup>++</sup> | 84,6  | ---   | ---                |
| Spz II                          | 56,9 <sup>++</sup> | 40,0 <sup>++</sup> | 79,1  | 105,5 | 100,4              |
| runde Spt                       | 107,3              | ---                | 96,7  | 78,9  | 47,1 <sup>++</sup> |
| elong. Spt                      | 91,1               | 96,7               | 124,9 | 110,2 | 94,9               |
| 26 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |       |       |                    |
| Sertoliz.                       | 106,7              | 109,7              | 114,7 | 118,2 | 92,5               |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 104,4              | ---                | ---   | 95,2  | 107,2              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 79,4               | ---   | ---   | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 78,3  | ---   | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---   | 94,3  | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---   | ---   | 89,1               |
| Spz I                           | 109,8              | 101,3              | 100,1 | ---   | ---                |
| Spz II                          | 112,9              | 96,3               | 93,5  | 106,9 | 98,7               |
| runde Spt                       | 88,5               | ---                | 113,7 | 128,1 | 79,9               |
| elong. Spt                      | 122,3              | 119,8              | 85,7  | 145,2 | 53,3               |

Tab. 3: Tagesdurchschnitte der Zellen des Tubulusepithels vom ersten bis dritten Entnahmetag nach 3,3 TE (in % der Gesamtdurchschnitte der Kontrollreihe)

|                                 | Stadien            |                    |                    |                    |                    |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                 | VII-VIII           | X                  | XII                | III                | V                  |
| 10 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |                    |                    |                    |
| Sertoliz.                       | 97,8               | 82,8               | 126,7              | 95,9               | 94,7               |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 87,0               | ---                | ---                | 104,8              | 85,7               |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 69,4               | ---                | ---                | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 45,7               | ---                | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---                | 10,9 <sup>++</sup> | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---                | ---                | 2,7 <sup>++</sup>  |
| Spz I                           | 2,6 <sup>++</sup>  | 5,2 <sup>++</sup>  | 8,3 <sup>++</sup>  | ---                | ---                |
| Spz II                          | 74,8               | 68,5               | 97,9               | 5,6 <sup>++</sup>  | 33,3 <sup>++</sup> |
| runde Spt                       | 108,8              | ----               | 80,3               | 85,8               | 77,3               |
| elong. Spt                      | 105,8              | 82,8               | 79,2               | 103,7              | 98,0               |
| 18 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |                    |                    |                    |
| Sertoliz.                       | 100,0              | 109,7              | 102,0              | 95,2               | 94,7               |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 104,4              | ---                | ---                | 126,9              | 107,2              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 114,1              | ---                | ---                | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 126,1              | ---                | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---                | 130,5              | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---                | ---                | 136,7              |
| Spz I                           | 46,4 <sup>++</sup> | 26,1 <sup>++</sup> | 39,9 <sup>++</sup> | ---                | ---                |
| Spz II                          | 0,0 <sup>++</sup>  | 2,7 <sup>++</sup>  | 0,0 <sup>++</sup>  | 10,6 <sup>++</sup> | 0,0 <sup>++</sup>  |
| runde Spt                       | 55,6 <sup>++</sup> | ---                | 18,1 <sup>++</sup> | 0,5 <sup>++</sup>  | 40,0 <sup>++</sup> |
| elong. Spt                      | 52,6 <sup>++</sup> | 96,5               | 77,0               | 85,5               | 89,0               |
| 26 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |                    |                    |                    |
| Sertoliz.                       | 124,4              | 107,5              | 133,9              | 129,4              | 101,5              |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 113,0              | ---                | ---                | 133,3              | 107,2              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 133,9              | ---                | ---                | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 117,4              | ---                | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---                | 134,2              | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---                | ---                | 106,2              |
| Spz I                           | 116,0              | 115,4              | 94,4               | ---                | ---                |
| Spz II                          | 91,0               | 47,2 <sup>++</sup> | 70,3               | 150,0              | 107,9              |
| runde Spt                       | 0,8 <sup>++</sup>  | ---                | 68,4 <sup>++</sup> | 41,8 <sup>++</sup> | 0,0 <sup>++</sup>  |
| elong. Spt                      | 157,9              | 24,9 <sup>++</sup> | 16,0 <sup>++</sup> | 9,0 <sup>++</sup>  | 76,9               |

Tab. 4a: Tagesdurchschnitte der Zellen des Tubulusepithels vom ersten bis dritten Entnahmetag nach 10,0 TE (in % der Gesamtdurchschnitte der Kontrollreihe)

|                                 | Stadien            |                    |                    |                   |                    |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|                                 | VII-VIII           | X                  | XII                | III               | V                  |
| 34 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |                    |                   |                    |
| Sertoliz.                       | 104,4              | 94,0               | 107,6              | 93,7              | 101,5              |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 130,4              | ---                | ---                | 123,8             | 128,6              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 124,0              | ---                | ---               | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 123,9              | ---               | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---                | 105,1             | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---                | ---               | 109,8              |
| Spz I                           | 119,1              | 111,8              | 119,7              | ---               | ---                |
| Spz II                          | 126,5              | 103,9              | 69,0               | 93,8              | 92,3               |
| runde Spt                       | 58,9               | ---                | 213,2              | 108,8             | 121,0              |
| elong. Spt                      | 0,5 <sup>++</sup>  | 22,6 <sup>++</sup> | 33,4 <sup>++</sup> | 5,9 <sup>++</sup> | 0,2 <sup>++</sup>  |
| 42 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |                    |                   |                    |
| Sertoliz.                       | 106,7              | 94,0               | 117,4              | 104,8             | 108,3              |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 113,0              | ---                | ---                | 114,3             | 107,2              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 94,2               | ---                | ---               | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 94,6               | ---               | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---                | 110,6             | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---                | ---               | 88,2               |
| Spz I                           | 97,9               | 74,7 <sup>++</sup> | 98,5               | ---               | ---                |
| Spz II                          | 94,1               | 81,0               | 109,2              | 108,3             | 94,0               |
| runde Spt                       | 82,7 <sup>++</sup> | ---                | 121,0              | 104,0             | 94,3               |
| elong. Spt                      | 28,5 <sup>++</sup> | 79,4 <sup>++</sup> | 94,7 <sup>++</sup> | 98,9              | 65,2 <sup>++</sup> |
| 50 Tage nach Behandlungsbeginn: |                    |                    |                    |                   |                    |
| Sertoliz.                       | 102,2              | 103,0              | 110,0              | 95,9              | 115,0              |
| A <sub>1</sub> -Spg             | 69,6               | ---                | ---                | 104,8             | 117,9              |
| A <sub>2</sub> -Spg             | ---                | 128,9              | ---                | ---               | ---                |
| A <sub>3</sub> -Spg             | ---                | ---                | 97,8               | ---               | ---                |
| Im-Spg                          | ---                | ---                | ---                | 117,8             | ---                |
| B-Spg                           | ---                | ---                | ---                | ---               | 110,7              |
| Spz I                           | 86,1               | 135,8              | 110,9              | ---               | ---                |
| Spz II                          | 95,0               | 134,7              | 121,8              | 90,0              | 115,1              |
| runde Spt                       | 99,7               | ---                | 169,7              | 111,5             | 128,0              |
| elong. Spt                      | 121,7              | 116,1              | 153,0              | 116,3             | 117,0              |

Tab. 4b: Tagesdurchschnitte der Zellen des Tubulusepithels vom vierten bis sechsten Entnahmetag nach 10,0 TE (in % der Gesamtdurchschnitte der Kontrollreihe)

Tab. 3 gibt die relativen Anzahlen der vorhandenen Zellen für die 3,3 TE-Reihe vom 10. bis 26. Tag nach Behandlungsbeginn wieder. Die entsprechenden Werte der 10,0 TE-Reihe, jedoch bis zum 50. Tag, finden sich in den Tabellen 4a und 4b.

Die nach dem  $\chi^2$ -Test hochsignifikant kleineren Tageswerte der beiden Procarbacinreihen gegenüber den Tagesdurchschnitten (!) der Kontrollreihe sind mit ++ gekennzeichnet. Bei 37 dieser gekennzeichneten Werte war die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1 %, bei 6 Werten kleiner als 1 %.

Mit Varianzanalysen (Tab. 5) und Scheffé-Tests wurden in Stadium VII-VIII dieselben Werte als signifikant unterschiedlich gefunden wie mit dem  $\chi^2$ -Test, jedoch in drei Fällen mit abweichender Irrtumswahrscheinlichkeit (5 %). Innerhalb der 10,0 TE-Reihe unterschied sich bei den R-Spz der 10. Tag hochsignifikant vom 26., 34., 42. und 50. Tag, der 18. Tag hochsignifikant vom 26. und 34., bei den pachytänen Spz (= Spz II) der 18. Tag hochsignifikant vom 10., 26., 34., 42. und 50., bei den runden Spt der 26. Tag hochsignifikant vom 10. und 50. und signifikant vom 42., bei den elongierten Spt der 34. Tag hochsignifikant vom 26. und 50. und signifikant vom 10., der 42. Tag hochsignifikant vom 26. und der 18. Tag signifikant vom 26.

Nach den Tabellen 4a und 4b sowie der statistischen Verlaufskontrolle innerhalb der mit 10,0 TE behandelten Reihe liegt das Schädigungsmaximum am 10. Tag im Bereich von B-Spg bis frühen pachytänen Spz, am 18. Tag im gesamten Bereich der pachytänen Spz, am 26. Tag im Bereich der runden Spt und am 34. Tag im Bereich der elongierten Spt. Am 42. Tag sind nur noch weniger ausgeprägte Schädigungen besonders bei den elongierten Spt zu beobachten.

Das Ausmaß der Schädigung schwankt in den betroffenen Zellgenerationen zwischen völligem Verlust der entsprechenden Zellen und Reduzierung um ca. 40 %.

| Faktoren                             | SAQ         | FG | MAQ         | F        | P    |
|--------------------------------------|-------------|----|-------------|----------|------|
| <b>A<sub>1</sub>-Spermatogonien:</b> |             |    |             |          |      |
| BC(A, D)                             | 46, 5000    | 36 | 1, 2916     |          |      |
| A D                                  | 2, 1667     | 5  | 0, 4333     | 0, 3354  |      |
| A                                    | 6, 9167     | 5  | 1, 3833     | 1, 0709  |      |
| D                                    | 0, 0833     | 1  | 0, 0833     | 0, 0644  |      |
| <b>R Spermatozyten:</b>              |             |    |             |          |      |
| BC(A, D)                             | 3801, 2500  | 36 | 105, 5902   |          |      |
| A D                                  | 3704, 6042  | 5  | 740, 9208   | 7, 0169  | <1 % |
| A                                    | 6471, 4375  | 5  | 1294, 2875  | 12, 2576 | <1 % |
| D                                    | 1376, 0208  | 1  | 1376, 0208  | 13, 0317 | <1 % |
| <b>pachytäne Spermatozyten:</b>      |             |    |             |          |      |
| BC(A, D)                             | 6322, 2500  | 36 | 175, 6180   |          |      |
| A D                                  | 6965, 8542  | 5  | 1393, 1708  | 7, 9329  | <1 % |
| A                                    | 5707, 8542  | 5  | 1141, 5708  | 6, 5003  | <1 % |
| D                                    | 1530, 0208  | 1  | 1530, 0208  | 8, 7122  | <1 % |
| <b>runde Spermatiden:</b>            |             |    |             |          |      |
| BC(A, D)                             | 74055, 2500 | 36 | 2057, 0902  |          |      |
| A D                                  | 29178, 6875 | 5  | 5835, 7375  | 2, 8368  | <5 % |
| A                                    | 65761, 6875 | 5  | 13152, 3375 | 6, 3936  | <1 % |
| D                                    | 28665, 1875 | 1  | 28665, 1875 | 13, 9348 | <1 % |
| <b>elongierte Spermatiden:</b>       |             |    |             |          |      |
| BC(A, D)                             | 66593, 5000 | 36 | 1849, 8194  |          |      |
| A D                                  | 63385, 1667 | 5  | 12677, 0333 | 6, 8531  | <1 % |
| A                                    | 31723, 6667 | 5  | 6344, 7333  | 3, 4299  | <5 % |
| D                                    | 7008, 3333  | 1  | 7008, 3333  | 3, 7886  |      |
| A = Zeit                             |             |    |             |          |      |
| B = Tubulus                          |             |    |             |          |      |
| C = Tier                             |             |    |             |          |      |
| D = Behandlung                       |             |    |             |          |      |

Tab. 5: Ergebnisse der Varianzanalysen zu den Zellgenerationen des Stadiums VII-VIII in der Kontrollreihe und der 10, 0 TE-Reihe

In den Tabellen nicht aufgeführt werden die  $A_O$ -Spg (nach Oakberg, 1971, und Huckins, 1971,  $A_S$ -Spg). Sie waren in der Kontrollreihe und in der 3,3 TE-Reihe nur sehr selten zu beobachten, so daß sie allenfalls durch eine wesentliche Steigerung der ausgezählten Tubuli erfaßbar gewesen wären. Im Gegensatz zu diesen beiden Reihen fielen nach 10,0 TE zahlreiche  $A_O$ -Spg (Abb. 6) in dem Zeitraum vom 18. bis 34. Tag auf. Nach dem 34. Tag waren sie auch in dieser Reihe nur noch selten zu finden.

Die Anzahl der Tubuli, die von den bisher beschriebenen oder auch anderen Schädigungen betroffen waren, wird für die drei Reihen in den Tab. 6 bis 8 wiedergegeben.

|                   | Tage nach Behandlungsbeginn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 10                          | 18  | 26  | 34  | 42  | 50  | 58  | 66  | 74  | 82  |
| Tubuli insgesamt  | 506                         | 617 | 400 | 497 | 478 | 469 | 458 | 693 | 675 | 330 |
| normale Spgen.    | 481                         | 471 | 348 | 441 | 460 | 446 | 437 | 662 | 655 | 306 |
| einzelne Lücken   | 1                           | 2   | 20  | 17  | 6   | 4   | 7   | 7   | 3   | 4   |
| geringe Hemmung   | 7                           | 24  | 11  | 15  | 4   | 5   | 4   | 14  | 6   | 6   |
| starke Hemmung    | 1                           | 43  | 6   | 5   | 3   | 2   | 1   | 2   | 1   | 1   |
| Stop iHd Spt a    | 0                           | 11  | 0   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| b                 | 0                           | 3   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| r-Spt-Mangel      | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Spz-Mangel        | 15                          | 45  | 15  | 14  | 5   | 11  | 9   | 8   | 9   | 13  |
| Stop iHd Spz a    | 0                           | 13  | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| b                 | 0                           | 10  | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Stop iHd Spg a    | 1                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   |
| b                 | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Sertoli cell only | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Kombinationen     | 0                           | 5   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |

Tab. 6: Spermatogenesedefekte und die von ihnen betroffenen Tubuli in der Kontrollreihe

In der Kontrollreihe wurden 8,1 % aller Tubuli als geschädigt registriert. Dabei lagen überwiegend schwache Spermatogenesedefekte in Form von einzelnen Lücken im Keimepithel, Spermatogenesehemmung geringeren Grades und leichter Mangel an Spz vor. Am 18. Tag wies ein Tier zahlreiche, darunter auch stärker geschädigte Tubuli auf.

|                   | Tage nach Behandlungsbeginn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 10                          | 18  | 26  | 34  | 42  | 50  | 58  | 66  | 74  | 82  |
| Tubuli insgesamt  | 472                         | 578 | 443 | 525 | 568 | 513 | 639 | 450 | 638 | 439 |
| normale Spgen.    | 430                         | 465 | 396 | 474 | 543 | 470 | 584 | 352 | 428 | 368 |
| einzelne Lücken   | 1                           | 1   | 11  | 18  | 7   | 4   | 12  | 38  | 50  | 24  |
| geringe Hemmung   | 11                          | 47  | 19  | 17  | 6   | 7   | 14  | 8   | 19  | 6   |
| starke Hemmung    | 1                           | 34  | 13  | 7   | 6   | 16  | 13  | 36  | 66  | 18  |
| Stop iHd Spt a    | 0                           | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 13  | 0   |
| b                 | 0                           | 0   | 1   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 16  | 0   |
| r-Spt-Mangel      | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Spz-Mangel        | 29                          | 30  | 12  | 13  | 6   | 7   | 9   | 9   | 21  | 19  |
| Stop iHd Spz a    | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 5   | 0   |
| b                 | 0                           | 0   | 0   | 2   | 0   | 4   | 8   | 10  | 34  | 8   |
| Stop iHd Spg a    | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 3   | 7   | 5   |
| b                 | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 6   | 0   |
| Sertoli cell only | 0                           | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 4   | 6   | 0   |
| Kombinationen     | 0                           | 0   | 9   | 6   | 0   | 2   | 3   | 10  | 33  | 9   |

Tab. 7: Spermatogenesedefekte und die von ihnen betroffenen Tubuli nach 3,3 TE Procarbacin

In der 3,3 TE-Reihe stieg der Anteil der Tubuli mit beeinträchtigter Spermatogenese auf 14,3 % an. Dieser Anstieg gegenüber den Kontrollen geht wesentlich auf eine Zunahme stärkerer Defekte (Spermatogenesehemmung stärkeren Grades, Stop in Höhe der Spz) zurück. Das größte Ausmaß wurde am 74. Tag mit 33 % erreicht.

Ein völlig anderes Schädigungsbild trat nach 10,0 TE Procarbacin auf. Am 10. Tag zeigten 56 % aller Tubuli Defekte fast ausschließlich in Form des Spz-Mangels. Vom 18. bis 34. Tag wurden je 85 bis 86 % der Tubuli als geschädigt eingestuft; dabei überwogen am 18. Tag Mangel an Spz, Stop in Höhe der Spg und Stop in Höhe der Spz, am 26. Tag Stop in Höhe der Spz und der Spt sowie Mangel an runden Spt und am 34. Tag nur noch Stop in Höhe der Spt. Das Schädigungsausmaß ging am 42. Tag auf 54 % zurück. Vom 50. bis 82. Tag lag der Anteil der defekten Tubuli mit 14,3 % und dabei vorwiegend geringeren Schädigungsgraden wieder relativ nahe an den Kontrollwerten.

|                   | Tage nach Behandlungsbeginn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 10                          | 18  | 26  | 34  | 42  | 50  | 58  | 66  | 74  | 82  |
| Tubuli insgesamt  | 393                         | 544 | 476 | 360 | 374 | 358 | 431 | 498 | 443 | 443 |
| normale Sphen.    | 174                         | 74  | 71  | 51  | 171 | 319 | 372 | 430 | 390 | 351 |
| einzelne Lücken   | 8                           | 1   | 7   | 25  | 66  | 15  | 16  | 23  | 10  | 19  |
| geringe Hemmung   | 10                          | 5   | 14  | 4   | 3   | 2   | 5   | 22  | 6   | 11  |
| starke Hemmung    | 19                          | 48  | 22  | 36  | 60  | 3   | 8   | 1   | 1   | 18  |
| Stop iHd Spt a    | 0                           | 0   | 4   | 20  | 50  | 6   | 9   | 7   | 8   | 1   |
| b                 | 0                           | 0   | 134 | 205 | 31  | 0   | 2   | 2   | 3   | 0   |
| r-Spt-Mangel      | 0                           | 51  | 72  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| Spz-Mangel        | 180                         | 163 | 7   | 0   | 4   | 12  | 15  | 12  | 21  | 13  |
| Stop iHd Spz a    | 0                           | 5   | 118 | 36  | 3   | 0   | 4   | 0   | 1   | 0   |
| b                 | 0                           | 138 | 124 | 39  | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 15  |
| Stop iHd Spg a    | 8                           | 139 | 4   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 3   | 20  |
| b                 | 2                           | 92  | 0   | 0   | 3   | 0   | 1   | 0   | 0   | 6   |
| Sertoli cell only | 0                           | 2   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 0   | 1   | 4   |
| Kombinationen     | 8                           | 174 | 101 | 57  | 20  | 0   | 2   | 1   | 1   | 15  |

Tab. 8: Spermatogenesedefekte und die von ihnen betroffenen Tubuli nach 10,0 TE Procarbacin

Morphologische Veränderungen wurden in den procarbacin-behandelten Reihen nur selten beobachtet.

Degenerationen und Nekrosen sind zusammen mit der Zellverminderung quantitativ erfaßt worden. Die 10,0 TE-Reihe zeigte mit 1,3 degenerierenden oder nekrotischen Zellen je Tubulus (bei insgesamt 116 Tubuli) nur unwesentlich mehr Zelluntergänge als die Kontrollreihe mit 1,1 (bei 120 Tubuli). In der 3,3 TE-Reihe lag der Wert für die ersten drei Entnahmetage mit 0,7 noch unter dem der Kontrollen. Ein einzelner, erhöhter Wert wurde am 18. Tag nach 10,0 TE mit 4,1 gefunden. Er beruhte im wesentlichen auf Degenerationen und Nekrosen im Bereich der Spt.

Bei nicht quantitativer Untersuchung der histologischen Präparate ergab sich keine augenfällige Differenz zwischen den drei Reihen. Die weitaus meisten Tubuli enthielten keine nekrotischen Zellen. In den restlichen Tubuli wurden in der Regel nur sehr wenige Degenerationen und Nekrosen gefunden. Die seltenen Tubuli mit zahlreichen degenerierenden Zellen waren gleichmäßig über alle Präparate verteilt und ließen keinen zeitlichen oder räumlichen Zusammenhang erkennen.

Entzündliche Infiltrate wurden bei keinem Tier und in keiner Reihe gefunden.

Ein deutlicher Einfluß von Procarbacin zeigte sich dagegen auf die Entstehung von mehrkernigen Zellen. Zwar traten fünf solcher Zellen auch bei den Kontrolltieren auf, aber diese Zahl übertrafen die procarbacinbehandelten Reihen vielfach. Nach 3,3 TE wiesen 11 der 20 Tiere zwischen einem und acht und nach 10,0 TE 10 der 20 Tiere zwischen einem und 37 Tubuli mit mehrkernigen Zellen gleichmäßig über alle Entnahmetage verteilt auf.

Zwei verschiedene Formen solcher Zellen waren zu unterscheiden. Die einen waren durch Kerne mit der Struktur von pachytänen Spz, die anderen durch Kerne mit der Struktur von degenerierenden Spt

charakterisiert (Abb. 7 und 8).

Am 66. Tag wurden in der 10,0 TE-Reihe in einem Tubulus im Stadium XII einige Zellen mit drei oder vier Metaphaseplatten gefunden (Abb. 7). Diese Zellen waren synchron zu den einkernigen metaphasischen Spz in Teilung begriffen.

Am 90. Tag, der wegen Mangels an Kontrolltieren nicht mehr ausgewertet wurde, bot ein Tier besonders zahlreiche und große Riesenzellen mit kreisförmig angeordneten Spt-Kernen. Darunter befand sich eine Zelle, die sich zentral durch den Kernring einschnürte (Abb. 8). Zwischen beiden Hälften blieb eine breite Zytoplasmabrücke bestehen.

Mögliche Änderungen der Spermatogenesekinetik sollten durch die Stadienbestimmung erfaßt werden. Das Ergebnis findet sich in Tab. 9. Sie gibt den prozentualen Anteil der Tubuli in den Stadien I bis XII bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten quergeschnittenen Tubuli für die drei Reihen wieder. In der Kontrollreihe wurden die Stadien von 759 Tubuli bestimmt, in der 3,3 TE-Reihe die Stadien von 498 Tubuli und in der 10,0 TE-Reihe die Stadien von 388 Tubuli.

| Stadium | Kontrolle | 3,3 TE | 10,0 TE |
|---------|-----------|--------|---------|
| I       | 11,7      | 8,8    | 10,8    |
| II      | 15,4      | 16,4   | 14,7    |
| III     | 8,6       | 8,0    | 8,5     |
| IV      | 5,8       | 6,0    | 6,7     |
| V       | 8,4       | 6,2    | 7,0     |
| VI      | 4,5       | 6,8    | 5,4     |
| VII     | 8,3       | 10,0   | 6,7     |
| VIII    | 6,6       | 9,0    | 9,0     |
| IX      | 12,5      | 11,0   | 16,2    |
| X       | 7,4       | 5,6    | 5,7     |
| XI      | 4,2       | 5,4    | 1,8     |
| XII     | 6,6       | 6,2    | 7,5     |

Tab. 9: Relative Häufigkeit der Spermatogenesestadien  
(in % der ausgewerteten quergeschnittenen Tubuli)

Tab. 10 gibt über die (kleinsten) Tubulusdurchmesser im Verlauf des Versuchs Auskunft. Unterschiede zwischen den drei Reihen konnten für keinen Entnahmetag statistisch gesichert werden (Tab. 11), obwohl am 18. Tag nach 10,0 TE ein starker Abfall - begleitet von einem weniger deutlichen Abfall der anderen Reihen - zu beobachten war. Signifikant kleiner war lediglich innerhalb der 10,0 TE-Reihe der 18. Tag gegenüber dem 10., dem 58., dem 66. und dem 74., hochsignifikant gegenüber dem 82. Tag.

| Tage nach<br>Behandl. -<br>Beginn | Kontrolle | 3,3 TE | 10,0 TE |
|-----------------------------------|-----------|--------|---------|
| 10                                | 201,3     | 203,3  | 216,0   |
| 18                                | 178,2     | 171,2  | 145,6   |
| 26                                | 199,1     | 177,5  | 174,3   |
| 34                                | 189,9     | 191,5  | 178,9   |
| 42                                | 207,9     | 214,8  | 197,0   |
| 50                                | 198,9     | 172,0  | 206,5   |
| 58                                | 215,8     | 206,8  | 212,6   |
| 66                                | 220,6     | 223,4  | 213,1   |
| 74                                | 224,5     | 206,7  | 215,8   |
| 82                                | 214,3     | 216,4  | 224,2   |
| Ø                                 | 205,0     | 198,4  | 198,4   |

Tab. 10: Kleinste Tubulusdurchmesser (in  $\mu$ )

| Faktoren | SAQ        | FG | MAQ       | F      | P    |
|----------|------------|----|-----------|--------|------|
| B(A, C)  | 6595,6973  | 30 | 219,8565  |        |      |
| A C      | 4015,5851  | 18 | 223,0881  | 1,0146 |      |
| A        | 17343,1119 | 9  | 1927,0124 | 8,7648 | <1 % |
| C        | 591,6994   | 2  | 295,8497  | 1,3456 |      |

A = Zeit

B = Tier

C = Behandlung

Tab. 11: Ergebnis der Varianzanalyse zu den kleinsten Tubulusdurchmessern

Die Ergebnisse der Tubuluswandmessung finden sich in Tab. 12. Hochsignifikant unterschied sich die 10,0 TE-Reihe von den Kontrollen am 18. und 26. Tag, signifikant am 34. und 66. Tag. In der 3,3 TE-Reihe lag der Wert des 74. Tages signifikant über dem entsprechenden Kontrollwert.

Außerdem ist die Tubuluswand nach 10,0 TE am 18., 26., 34. und 42. Tag hochsignifikant stärker als die der 3,3 TE-Reihe. Innerhalb der 10,0 TE-Reihe ist der Wert des 18. Tages hochsignifikant größer als die des 74. und 82. Tages und signifikant größer als die des 10. und 58. Tages. Der Wert des 26. Tages ist hochsignifikant größer als der des 74. und signifikant größer als der des 82. Tages (vgl. auch Tab. 13).

| Tage nach<br>Behandl. -<br>Beginn | Kontrolle | 3,3 TE | 10,0 TE |
|-----------------------------------|-----------|--------|---------|
| 10                                | 1,66      | 1,69   | 1,71    |
| 18                                | 1,70      | 1,69   | 1,98    |
| 26                                | 1,69      | 1,76   | 1,96    |
| 34                                | 1,74      | 1,68   | 1,90    |
| 42                                | 1,77      | 1,68   | 1,90    |
| 50                                | 1,73      | 1,67   | 1,76    |
| 58                                | 1,68      | 1,65   | 1,72    |
| 66                                | 1,62      | 1,73   | 1,77    |
| 74                                | 1,61      | 1,78   | 1,67    |
| 82                                | 1,65      | 1,68   | 1,68    |
| Ø                                 | 1,68      | 1,70   | 1,81    |

Tab. 12: Tubuluswandstärke (in  $\mu$ )

| Faktoren | SAQ    | FG | MAQ    | F       | P     |
|----------|--------|----|--------|---------|-------|
| B(A, C)  | 0,0976 | 30 | 0,0033 |         |       |
| A C      | 0,1932 | 18 | 0,0107 | 3,2424  | < 1 % |
| A        | 0,1420 | 9  | 0,0158 | 4,7878  | < 1 % |
| C        | 0,1777 | 2  | 0,0888 | 26,9090 | < 1 % |

A = Zeit  
B = Tier  
C = Behandlung

Tab. 13: Ergebnis der Varianzanalyse zur Tubuluswandstärke

### Leydigzellen:

Die Kontrolltiere wiesen über die gesamte Versuchsdauer einen durchschnittlichen Leydigzellflächenanteil von 7,7 % des Hodengewebes auf. Ihre Tagesdurchschnitte bewegten sich zwischen 6,6 und 9,4 % (Tab. 14).

Nach 3,3 TE Procarbacin lag der Flächenanteil im Gesamtdurchschnitt bei 8,4 %. Die höchsten Einzelwerte wurden mit 10,1 und 10,7 % am 2. und 3. Entnahmetag gefunden.

10,0 TE hatten eine Zunahme des Flächenanteils auf 21,2 % nach 18 Tagen zur Folge. Er kehrte über 14,5 und 13,1 % an den folgenden Entnahmetagen zurück zur Norm.

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der 10,0 TE-Reihe und der Kontrolle am 18. ( $p < 1\%$ ) und 26. Tag ( $p < 5\%$ ). Innerhalb der 10,0 TE-Reihe unterschied sich der 18. Tag hochsignifikant vom 10., 50., 66., 74. und 82. Tag, signifikant vom 42. und 58. Tag (vgl. Tab. 15).

Als Parameter für die Leydigzellgröße wurden auf einer Strecke von insgesamt 1,16 mm je Tier im Durchschnitt der ersten sieben Entnahmetage in der Kontrollreihe 114,7, in der 3,3 TE-Reihe 116,1 und in der 10,0 TE-Reihe 112,7 Leydigzellen gezählt. Eine Varianzanalyse (Tab. 16) ergab, daß weder zwischen den Behandlungsreihen an den einzelnen Entnahmetagen noch zwischen den Entnahmetagen innerhalb einer Reihe ein Unterschied bestand.

Zytologische Veränderungen traten in der Phase der Leydigzellzunahme nicht auf. Mitosefiguren (Abb. 10), die in allen drei Reihen nur sehr selten zu beobachten waren, konnten nicht gehäuft gefunden werden.

Dagegen traten in der Phase der Flächenabnahme vom 26. über den 34. bis zum 42. Tag nach 10,0 TE deutlich gegenüber den Kontrollen vermehrt kleinere Leydigzellen mit verstärkt eosinophilem

Zytoplasma und pyknotisch bis degenerativ **veränderten** Kernen auf (Abb. 11).

|                                   | Kontrolle                 |                        | 3,3 TE                    |                        | 10,0 TE                   |                        |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| Tage nach<br>Behandl. -<br>Beginn | Flächen-<br>anteil<br>(%) | Zellen<br>je<br>1,16mm | Flächen-<br>anteil<br>(%) | Zellen<br>je<br>1,16mm | Flächen-<br>anteil<br>(%) | Zellen<br>je<br>1,16mm |
| 10                                | 7,5                       | 120,0                  | 7,6                       | 118,5                  | 7,6                       | 115,0                  |
| 18                                | 8,3                       | 115,5                  | 10,1                      | 116,5                  | 21,2 <sup>++</sup>        | 110,5                  |
| 26                                | 7,7                       | 109,5                  | 10,7                      | 120,0                  | 14,5 <sup>+</sup>         | 116,5                  |
| 34                                | 9,4                       | 114,0                  | 9,4                       | 113,5                  | 13,1                      | 112,0                  |
| 42                                | 7,0                       | 117,0                  | 8,8                       | 119,0                  | 9,1                       | 115,5                  |
| 50                                | 7,8                       | 116,5                  | 8,7                       | 114,5                  | 8,1                       | 107,5                  |
| 58                                | 6,6                       | 110,5                  | 7,4                       | 111,0                  | 9,0                       | 112,0                  |
| 66                                | 7,4                       |                        | 7,9                       |                        | 6,7                       |                        |
| 74                                | 7,4                       |                        | 6,3                       |                        | 7,5                       |                        |
| 82                                | 8,0                       |                        | 7,2                       |                        | 7,4                       |                        |
| Ø                                 | 7,7                       | 114,7                  | 8,4                       | 116,1                  | 10,4                      | 112,7                  |

Tab. 14: Leydigzellflächenanteil am Hodenparenchym und (als Größenmaß) Leydigzellanzahl auf einer Strecke von 1,16 mm

| Faktoren | SAQ       | FG | MAQ      | F      | P     |
|----------|-----------|----|----------|--------|-------|
| B(A, C)  | 4479,0000 | 30 | 149,3000 |        |       |
| A C      | 4917,3000 | 18 | 273,1833 | 1,8297 |       |
| A        | 5635,4000 | 9  | 626,1556 | 4,1939 | < 1 % |
| C        | 1979,0333 | 2  | 989,5167 | 6,6277 | < 1 % |

A = Zeit  
B = Tier  
C = Behandlung

Tab. 15: Ergebnis der Varianzanalyse zum Leydigzellflächenanteil

| Faktoren | SAQ       | FG | MAQ      | F       | P |
|----------|-----------|----|----------|---------|---|
| B(A, C)  | 378, 0000 | 21 | 18, 0000 |         |   |
| A C      | 207, 2857 | 12 | 17, 2738 | 0, 9596 |   |
| A        | 208, 1429 | 6  | 34, 6905 | 1, 9272 |   |
| C        | 83, 0476  | 2  | 41, 5238 | 2, 3068 |   |

A = Zeit

B = Tier

C = Behandlung

Tab. 16: Ergebnis der Varianzanalyse zur Leydigzellgröße

#### Vaskularisation:

Die Tab. 17 gibt sowohl die einzelnen Tagesdurchschnitte als auch die Gesamtdurchschnitte der je Quadratmillimeter Hodenparenchym gezählten Blutgefäße für die drei Reihen bei 202-facher und 512-facher Vergrößerung wieder. Den Einfluß der Vergrößerung auf die Anzahl der je Flächeneinheit zählbaren Gefäße beschreibt der Faktor F. Die signifikant bzw. hochsignifikant unterschiedlichen Tagesdurchschnitte der 3,3- und 10,0 TE-Reihe gegenüber den entsprechenden Kontrollwerten sind mit <sup>+</sup> bzw. <sup>++</sup> gekennzeichnet.

| Tage nach<br>Behandl. -<br>Beginn | Kontrolle                                         |       |      | 3, 3 TE                                           |                     |      | 10, 0 TE                                          |                     |      |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------|-------|------|---------------------------------------------------|---------------------|------|---------------------------------------------------|---------------------|------|
|                                   | Gefäße/mm <sup>2</sup><br>bei Vergr.<br>x202 x512 |       | F    | Gefäße/mm <sup>2</sup><br>bei Vergr.<br>x202 x512 |                     | F    | Gefäße/mm <sup>2</sup><br>bei Vergr.<br>x202 x512 |                     | F    |
| 10                                | 17,02                                             | 30,33 | 1,78 | 12,74                                             | 28,86               | 2,27 | 15,88                                             | 30,33               | 1,91 |
| 18                                | 22,05                                             | 37,50 | 1,70 | 21,65                                             | 34,38               | 1,59 | 33,64 <sup>+</sup>                                | 54,05 <sup>++</sup> | 1,61 |
| 26                                | 16,74                                             | 31,81 | 1,90 | 27,59 <sup>++</sup>                               | 47,06 <sup>++</sup> | 1,71 | 24,68 <sup>+</sup>                                | 50,83 <sup>++</sup> | 2,06 |
| 34                                | 21,19                                             | 34,75 | 1,64 | 23,93                                             | 43,76 <sup>++</sup> | 1,83 | 27,87                                             | 45,04 <sup>++</sup> | 1,62 |
| 42                                | 18,56                                             | 36,22 | 1,95 | 34,73 <sup>++</sup>                               | 48,72 <sup>++</sup> | 1,40 | 26,62 <sup>+</sup>                                | 45,04 <sup>++</sup> | 1,69 |
| 50                                | 20,62                                             | 34,38 | 1,67 | 29,36 <sup>++</sup>                               | 46,51 <sup>++</sup> | 1,58 | 18,68                                             | 39,98               | 2,14 |
| 58                                | 15,54                                             | 31,07 | 2,00 | 23,31 <sup>+</sup>                                | 36,95               | 1,59 | 21,71                                             | 33,83               | 1,56 |
| 66                                | 21,48                                             | 36,95 | 1,72 | 24,79                                             | 38,42               | 1,55 | 22,22                                             | 40,45               | 1,82 |
| 74                                | 24,85                                             | 41,92 | 1,69 | 28,62                                             | 46,88               | 1,64 | 21,42                                             | 33,09               | 1,54 |
| 82                                | 20,79                                             | 30,52 | 1,47 | 19,93                                             | 32,54               | 1,63 | 21,19                                             | 36,22               | 1,71 |
| Ø                                 | 19,88                                             | 34,54 | 1,74 | 24,66                                             | 40,41               | 1,64 | 23,39                                             | 40,89               | 1,75 |

Tab. 17: Vaskularisation bei 202-facher und 512-facher Vergrößerung und Einfluß der Vergrößerung (F)

Bei Vergrößerung x202 lag innerhalb der mit 3,3 TE Procarbacin behandelten Reihe der Wert des 42. Tages hochsignifikant bzw. signifikant über denen des 10., 18. und 82. Tages. Die Werte am 26., 42., 50., 66. und 74. lagen hochsignifikant bzw. signifikant über dem am 10. Tag. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1 bzw. 5 % unterschied sich in der 10,0 TE-Reihe der Wert des 18. Tages von denen des 10., 50., 58., 74. und 82. Tages. Außerdem lag die Zahl der Blutgefäße am 34. Tag signifikant über der am 10. Tag.

Bei 512-facher Vergrößerung bestanden innerhalb der 3,3 TE-Reihe hochsignifikante oder signifikante Unterschiede zwischen den Werten des 42. Tages und denen des 10., 18., 58. und 82. Tages, zwischen denen des 26., 50. und 74. Tages und jeweils denen des 10., 18. und 82. Tages sowie zwischen dem des 34. und dem des

# 10. Tages.

In der 10,0 TE-Reihe unterschieden sich hochsignifikant bzw. signifikant der Wert des 18. Tages von denen des 10., 50., 58., 66., 74. und 82. Tages, der des 26. Tages von denen des 10., 58., 74. und 82. Tages und die des 34. und 42. Tages jeweils von denen des 10. und 74. Tages.

| Faktoren | SAQ        | FG | MAQ        | F         | P     |
|----------|------------|----|------------|-----------|-------|
| B(A, D)  | 935, 9670  | 30 | 31, 1989   |           |       |
| A D      | 1555, 4679 | 18 | 86, 4149   | 2, 7698   | < 1 % |
| A        | 1659, 8056 | 9  | 184, 4228  | 5, 9111   | < 1 % |
| D        | 703, 2185  | 2  | 351, 6093  | 11, 2699  | < 1 % |
| BC(A, D) | 233, 9095  | 30 | 7, 7969    |           |       |
| A CD     | 170, 4671  | 18 | 9, 4704    | 1, 2146   |       |
| A C      | 122, 0939  | 9  | 13, 5660   | 1, 7399   |       |
| CD       | 40, 9001   | 2  | 20, 4501   | 2, 6228   |       |
| C        | 7648, 5922 | 1  | 7648, 5922 | 980, 9786 | < 1 % |

A = Zeit  
B = Tier  
C = Vergrößerung  
D = Behandlung

Tab. 18: Ergebnis der Varianzanalyse zur Vaskularisation

Die Varianzanalyse zeigte, daß die Vergrößerung ohne Einfluß auf die Ergebnisse in ihrer Abhängigkeit von Zeit, Behandlung und der Wechselwirkung Zeit-Behandlung blieb (Tab. 18).

Der Einfluß der Vergrößerung auf die Anzahl der je Flächeneinheit erkennbaren Gefäße (F) war in den drei Reihen gleich groß. (Wegen der offensichtlichen Übereinstimmung wurde hier keine Varianzanalyse durchgeführt.)

# CYTOPHOTOMETRIE I

## Ergebnisse der Fastgreen-Färbung

### I. Hodenspermatozoen

1. Tab. 19: Fastgreen-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen in der Kontrollreihe und den mit 3,3 TE - und 10 TE Procarbazin behandelten Reihen

| t  | Kontrolle |           |          | 3,3 TE |           |          | 10,0 TE |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|--------|-----------|----------|---------|-----------|----------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n      | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n       | $\bar{x}$ | $\sigma$ |
| 10 | 100       | 17,22     | 16,95    | 100    | 17,27     | 16,34    | 100     | 17,13     | 17,89    |
|    | 100       | 16,68     |          | 100    | 15,41     |          | 100     | 18,64     |          |
| 18 | 100       | 15,54     | 16,09    | 100    | 14,31     | 14,24    | 100     | 13,55     | 13,55    |
|    | 100       | 16,64     |          | 100    | 14,17     |          | ---     | --,--     |          |
| 26 | 78        | 15,32     | 15,38    | 100    | 15,22     | 15,07    | 100     | 15,08     | 15,43    |
|    | 100       | 15,43     |          | 100    | 14,91     |          | 100     | 15,78     |          |
| 34 | 100       | 17,15     | 16,91    | 100    | 14,01     | 13,96    | 25      | 10,64     | 12,08    |
|    | 25        | 16,67     |          | 100    | 13,90     |          | 56      | 13,52     |          |
| 42 | 100       | 17,40     | 17,14    | 100    | 12,00     | 12,72    | 100     | 11,75     | 10,55    |
|    | 100       | 16,87     |          | 100    | 13,43     |          | 100     | 9,35      |          |
| 50 | 100       | 16,20     | 15,67    | 100    | 12,27     | 12,17    | 100     | 12,57     | 13,24    |
|    | 100       | 15,14     |          | 100    | 12,07     |          | 100     | 13,91     |          |
| 58 | 100       | 15,49     | 16,08    | 100    | 13,88     | 14,82    | 100     | 15,60     | 15,50    |
|    | 100       | 16,67     |          | 100    | 15,76     |          | 100     | 15,39     |          |
| 66 | 100       | 14,47     | 14,58    | 100    | 14,03     | 14,07    | 100     | 15,32     | 14,94    |
|    | 100       | 14,68     |          | 100    | 14,11     |          | 100     | 14,55     |          |
| 74 | 100       | 14,05     | 13,86    | 100    | 13,71     | 14,47    | 100     | 13,20     | 13,67    |
|    | 100       | 13,67     |          | 100    | 15,23     |          | 100     | 14,14     |          |
| 82 | 100       | 13,63     | 13,24    | 100    | 13,27     | 14,02    | 100     | 11,13     | 11,51    |
|    | 100       | 12,84     |          | 100    | 14,76     |          | 100     | 11,88     |          |

2. Die mit diesen Ergebnissen durchgeführte Varianzanalyse wies auf signifikante Unterschiede hin:

2.1. Zwischen den Reihen zu jeweils gleichen Zeitpunkten mit  $P < 1 \%$ , d.h. Unterschiede zwischen Behandlungsreihen und

Kontrollreihe bzw. zwischen den Behandlungsreihen selbst

2.2. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb einer Reihe mit  $P < 1 \%$

2.3. Zwischen den einzelnen Reihen untereinander in ihrem Verlauf, d. h. daß sie nicht parallel verlaufen -  $P < 1 \%$

Zur genauen Lokalisation dieser signifikanten Unterschiede wurden die genannten Punkte mit anderen statistischen Tests näher untersucht.

ad 2.1. Mit Hilfe des Tukey-Tests ließ sich nachweisen, daß die Hodenspermatozoen der behandelten Tiere zu gewissen Zeitpunkten weniger stark mit der Fastgreen-Färbung anfärbbar waren als die der unbehandelten Tiere.

| t  | K ↔ 10 TE  | K ↔ 3,3 TE | 3,3 TE ↔ 10 TE |
|----|------------|------------|----------------|
| 10 | --         | --         | --             |
| 18 | $P < 5 \%$ | --         | --             |
| 26 | --         | --         | --             |
| 34 | $P < 1 \%$ | $P < 1 \%$ | --             |
| 42 | $P < 1 \%$ | $P < 1 \%$ | $P < 5 \%$     |
| 50 | $P < 5 \%$ | $P < 1 \%$ | --             |
| 58 | --         | --         | --             |
| 66 | --         | --         | --             |
| 74 | --         | --         | --             |
| 82 | --         | --         | $P < 5 \%$     |

ad 2.2. Mit Hilfe des Tukey-Tests wurden signifikant unterschiedliche Meßwerte innerhalb einer Reihe an folgenden Tagen gefunden:

### 2.2.1. Kontrolle

| Tage | ↔ | Tage | P     |
|------|---|------|-------|
| 82   |   | 10   | ◀ 1 % |
|      |   | 34   | ◀ 1 % |
|      |   | 42   | ◀ 1 % |
|      |   | 58   | ◀ 5 % |
| 74   |   | 10   | ◀ 5 % |
|      |   | 34   | ◀ 1 % |
|      |   | 42   | ◀ 1 % |

### 2.2.2. 3, 3 TE-Reihe

| Tage | ↔ | Tage | P     |
|------|---|------|-------|
| 50   |   | 10   | ◀ 1 % |
|      |   | 26   | ◀ 5 % |
| 42   |   | 10   | ◀ 1 % |

### 2.2.3. 10 TE-Reihe

| Tage   | ↔ | Tage   | P     |
|--------|---|--------|-------|
| 42     |   | 10     | ◀ 1 % |
|        |   | 26; 58 | ◀ 1 % |
|        |   | 66; 74 | ◀ 1 % |
| 82     |   | 10; 26 | ◀ 1 % |
|        |   | 58; 66 | ◀ 1 % |
| 34     |   | 10; 26 | ◀ 1 % |
|        |   | 58     | ◀ 1 % |
|        |   | 66     | ◀ 5 % |
| 50; 74 |   | 10     | ◀ 1 % |
| 66     |   | 10     | ◀ 5 % |

ad 2.3. Die Parallelitätsprüfung der drei Kurven erfolgte mit dem Scheffé-Test. Es wurde nur auf 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit hin geprüft.

2.3.1. Vergleich der 3,3 TE-Kurve mit der 10 TE-Kurve

|                                   |          |   |     |
|-----------------------------------|----------|---|-----|
| 2.3.1.1. Parallelität besteht von | Tag      | — | Tag |
|                                   | 10       |   | 26  |
|                                   | 34       |   | 42  |
|                                   | 50       |   | 58  |
|                                   | 50;58    |   | 66  |
|                                   | 50;58;66 |   | 74  |

|                                 |             |   |     |
|---------------------------------|-------------|---|-----|
| 2.3.1.2. Keine Parallelität von | Tag         | — | Tag |
|                                 | 10;26       |   | 34  |
|                                 | 34;42       |   | 50  |
|                                 | 50;58;66;74 |   | 82  |

2.3.2. Vergleich der Kontrollkurve gegen die 3,3 TE-/10 TE-Kurve, bezogen auf die Kurvenabschnitte der Behandlungsreihen, die Parallelität zeigen.

|                                   |       |   |     |
|-----------------------------------|-------|---|-----|
| 2.3.2.1. Parallelität besteht von | Tag   | — | Tag |
|                                   | 10    |   | 26  |
|                                   | 34    |   | 42  |
|                                   | 58    |   | 66  |
|                                   | 58;66 |   | 74  |

|                                 |     |   |     |
|---------------------------------|-----|---|-----|
| 2.3.2.2. Keine Parallelität von | Tag | — | Tag |
|                                 | 50  |   | 58  |

Der 18. Meßtag konnte bei allen drei Reihen aus den schon genannten Gründen nicht berücksichtigt werden.

## II. Nebenhodenspermatozoen

1. Tab. 20: Fastgreen-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen  
in der Kontrollreihe und den mit 3,3 TE - und  
10 TE Procarbazin behandelten Reihen

| t  | Kontrolle |           |          | 3,3 TE |           |          | 10,0 TE |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|--------|-----------|----------|---------|-----------|----------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n      | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n       | $\bar{x}$ | $\sigma$ |
| 10 | 100       | 18,92     | 20,01    | 100    | 15,89     | 16,89    | 100     | 16,40     | 17,65    |
|    | 100       | 21,10     |          | 100    | 17,88     |          | 100     | 18,89     |          |
| 18 | 100       | 18,97     | 18,17    | 100    | 18,02     | 18,13    | 100     | 17,43     | 17,43    |
|    | 100       | 17,37     |          | 100    | 18,23     |          | ---     | ---,---   |          |
| 26 | 100       | 17,93     | 17,60    | 100    | 16,01     | 17,72    | 100     | 14,15     | 14,41    |
|    | 100       | 17,27     |          | 100    | 19,42     |          | 52      | 14,67     |          |
| 34 | 100       | 19,88     | 18,31    | 100    | 19,85     | 18,91    | 100     | 18,18     | 17,93    |
|    | 100       | 16,73     |          | 100    | 17,96     |          | 100     | 17,68     |          |
| 42 | 100       | 16,71     | 16,03    | 100    | 16,12     | 14,16    | 44      | 13,22     | 14,28    |
|    | 100       | 15,35     |          | 100    | 12,20     |          | 100     | 15,33     |          |
| 50 | 100       | 17,03     | 19,23    | 100    | 15,72     | 16,94    | 100     | 16,81     | 14,08    |
|    | 100       | 21,42     |          | 100    | 18,15     |          | 100     | 11,34     |          |
| 58 | 100       | 20,39     | 20,98    | 100    | 19,12     | 18,91    | 100     | 18,98     | 18,91    |
|    | 100       | 21,56     |          | 100    | 18,69     |          | 100     | 18,83     |          |
| 66 | 100       | 20,21     | 20,66    | 100    | 17,73     | 17,78    | 100     | 14,12     | 16,14    |
|    | 100       | 21,11     |          | 100    | 17,82     |          | 100     | 18,15     |          |
| 74 | 100       | 18,66     | 17,89    | 100    | 18,75     | 17,89    | 100     | 18,74     | 18,80    |
|    | 100       | 17,12     |          | 100    | 17,02     |          | 100     | 18,86     |          |
| 82 | 100       | 19,45     | 18,86    | 100    | 20,29     | 19,45    | 100     | 20,05     | 19,73    |
|    | 100       | 18,27     |          | 100    | 18,61     |          | 100     | 19,41     |          |

2. Die mit diesen Ergebnissen durchgeführte Varianzanalyse wies  
auf signifikante Unterschiede hin:

2.1. Zwischen den Reihen zu jeweils gleichen Zeitpunkten mit  
 $P < 1 \%$

2.2. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb einer Reihe mit  
 $P < 1 \%$

2.3. Die Prüfung der Parallelität der drei Kurven zueinander ergab keine signifikanten Unterschiede. Sie verlaufen somit statistisch gesehen parallel.

Zur genauen Lokalisation der signifikanten Unterschiede wurden die genannten Punkte mit Hilfe des Tukey-Tests näher untersucht.

ad 2.1. Es ließ sich nachweisen, daß die Nebenhodenspermatozoen der behandelten Tiere (10 TE) zu gewissen Zeitpunkten weniger stark mit der Fastgreen-Färbung anfärbbar waren als die der unbehandelten Tiere.

| t  | K ↔ 10 TE | K ↔ 3,3 TE | 3,3 TE ↔ 10 TE |
|----|-----------|------------|----------------|
| 10 | --        | --         | --             |
| 18 | --        | --         | --             |
| 26 | --        | --         | --             |
| 34 | --        | --         | --             |
| 42 | --        | --         | --             |
| 50 | P < 1 %   | --         | --             |
| 58 | --        | --         | --             |
| 66 | P < 5 %   | --         | --             |
| 74 | --        | --         | --             |
| 82 | --        | --         | --             |

ad 2.2. Signifikant unterschiedliche Meßwerte innerhalb einer Reihe gab es nur bei der 10 TE-Reihe, nicht in der Kontroll- und 3,3 TE-Reihe.

#### 2.2.1. 10 TE-Reihe

| Tage | ↔ | Tage | P     |
|------|---|------|-------|
| 82   |   | 42   | < 5 % |
|      |   | 50   | < 5 % |

### III. Vergleich der Meßwerte der Hoden- und Nebenhoden-spermatozoen

Da die gemeinsame Varianzanalyse für Hoden und Nebenhoden signifikante Unterschiede mit  $P < 1 \%$  zwischen der Anfärbbarkeit der Hoden- und Nebenhodenspermatozoen anzeigte, wurde mit Hilfe des Tukey-Tests näher analysiert.

1. Tab. 21: Vergleich der Meßwerte der Kontrollreihen von Hoden und Nebenhoden

| t  | H. -NH. | P        |
|----|---------|----------|
| 10 | - 3,06  | $< 1 \%$ |
| 18 | - 2,08  | --       |
| 26 | - 2,22  | $< 5 \%$ |
| 34 | - 1,40  | --       |
| 42 | 1,11    | --       |
| 50 | - 3,56  | $< 1 \%$ |
| 58 | - 4,90  | $< 1 \%$ |
| 66 | - 6,08  | $< 1 \%$ |
| 74 | - 4,03  | $< 1 \%$ |
| 82 | - 5,62  | $< 1 \%$ |

H. -NH. = Meßwerte der Hodenspermatozoen minus  
Meßwerte der Nebenhodenspermatozoen

2. Tab. 22: Vergleich der Meßwerte der 3,3 TE-Reihen von Hoden und Nebenhoden

| t  | H. -NH. | P     |
|----|---------|-------|
| 10 | - 0,55  | --    |
| 18 | - 3,89  | ◀ 5 % |
| 26 | - 2,65  | ◀ 5 % |
| 34 | - 4,95  | ◀ 1 % |
| 42 | - 1,44  | --    |
| 50 | - 4,77  | ◀ 1 % |
| 58 | - 4,09  | ◀ 1 % |
| 66 | - 3,71  | ◀ 1 % |
| 74 | - 3,42  | ◀ 1 % |
| 82 | - 5,43  | ◀ 1 % |

Am 18. Tag ist trotz großer Differenz  $P = 5\%$ , da die Werte dieses Tages im Einzeltest mit dem partiell-hierarchischen Modell der Varianzanalyse untersucht wurden.

3. Tab. 23: Vergleich der Meßwerte der 10 TE-Reihen von Hoden und Nebenhoden

| t  | H. -NH. | P     |
|----|---------|-------|
| 10 | 0,24    | --    |
| 18 | - 2,88  | --    |
| 26 | 1,02    | --    |
| 34 | - 5,85  | ◀ 1 % |
| 42 | - 3,73  | ◀ 1 % |
| 50 | - 1,16  | --    |
| 58 | - 3,41  | ◀ 1 % |
| 66 | - 0,80  | --    |
| 74 | - 5,13  | ◀ 1 % |
| 82 | - 8,22  | ◀ 1 % |

# Ergebnisse der Sakaguchi-Färbung

## I. Hodenspermatozoen

1. Tab. 24: Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen in der Kontrollreihe und den mit 3,3 TE und 10 TE Procarbazin behandelten Reihen

| t  | Kontrolle |           |          | 3,3 TE |           |          | 10,0 TE |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|--------|-----------|----------|---------|-----------|----------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n      | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n       | $\bar{x}$ | $\sigma$ |
| 10 | 100       | 6,34      | 6,61     | 100    | 6,53      | 6,71     | 100     | 6,58      | 6,29     |
|    | 100       | 6,88      |          | 40     | 6,88      |          | 100     | 5,99      |          |
| 18 | 100       | 6,33      | 6,25     | 100    | 5,53      | 5,49     | 100     | 5,45      | 5,45     |
|    | 100       | 6,17      |          | 100    | 5,44      |          | ---     | -,--      |          |
| 26 | 100       | 6,70      | 6,24     | 100    | 4,73      | 4,87     | 100     | 5,24      | 5,33     |
|    | 100       | 5,78      |          | 100    | 5,00      |          | 100     | 5,41      |          |
| 34 | 100       | 6,11      | 5,91     | 100    | 5,48      | 5,46     | 100     | 4,98      | 4,85     |
|    | 100       | 5,70      |          | 100    | 5,44      |          | 25      | 4,72      |          |
| 42 | 100       | 5,80      | 5,90     | 100    | 5,52      | 5,34     | 100     | 4,87      | 4,70     |
|    | 100       | 5,99      |          | 100    | 5,16      |          | 100     | 4,52      |          |
| 50 | 100       | 5,93      | 6,09     | 100    | 5,15      | 5,17     | 100     | 4,25      | 4,31     |
|    | 100       | 6,25      |          | 100    | 5,19      |          | 100     | 4,36      |          |
| 58 | 100       | 4,93      | 5,25     | 25     | 4,84      | 4,72     | 100     | 5,21      | 4,63     |
|    | 100       | 5,56      |          | 100    | 4,59      |          | 100     | 4,04      |          |
| 66 | 100       | 4,54      | 4,78     | 100    | 4,73      | 4,52     | 100     | 4,21      | 4,32     |
|    | 100       | 5,01      |          | 100    | 4,31      |          | 100     | 4,42      |          |
| 74 | 100       | 4,84      | 5,03     | 100    | 4,43      | 4,47     | 100     | 4,47      | 4,63     |
|    | 100       | 5,22      |          | 100    | 4,50      |          | 100     | 4,78      |          |
| 82 | 100       | 4,89      | 4,66     | 100    | 4,62      | 4,37     | 100     | 4,16      | 4,35     |
|    | 100       | 4,43      |          | 100    | 4,12      |          | 100     | 4,54      |          |

2. Die mit diesen Ergebnissen durchgeführte Varianzanalyse wies auf signifikante Unterschiede hin:

2.1. Zwischen den Versuchsreihen zu jeweils gleichen Zeitpunkten mit  $P < 1\%$

2.2. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb einer Reihe mit  $P < 1 \%$

2.3. Die Prüfung über den Verlauf der drei Kurven zueinander ergab keine signifikanten Unterschiede. Ihr Verlauf ist somit als parallel aufzufassen.

Zur genauen Lokalisation der signifikanten Unterschiede wurden die genannten Punkte mit Hilfe des Tukey-Tests näher untersucht.

ad 2.1. Signifikant geringere Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen der behandelten Reihen gegenüber der Kontrollreihe tritt nach dem Tukey-Test zu mehreren Zeitpunkten auf.

| t  | K ↔ 10 TE  | K ↔ 3,3 TE | 3,3 TE ↔ 10 TE |
|----|------------|------------|----------------|
| 10 | --         | --         | --             |
| 18 | $P < 5 \%$ | --         | --             |
| 26 | $P < 1 \%$ | $P < 1 \%$ | --             |
| 34 | $P < 1 \%$ | --         | --             |
| 42 | $P < 1 \%$ | --         | --             |
| 50 | $P < 1 \%$ | $P < 5 \%$ | $P < 5 \%$     |
| 58 | --         | --         | --             |
| 66 | --         | --         | --             |
| 74 | --         | --         | --             |
| 82 | --         | --         | --             |

ad 2.2. Signifikant unterschiedliche Meßwerte innerhalb einer Reihe wurden mit dem Tukey-Test in allen drei Versuchsserien gefunden.

### 2.2.1. Kontrolle

| Tage | ↔ | Tage  | P     |
|------|---|-------|-------|
| 82   |   | 10;26 | ◀ 1 % |
|      |   | 34;42 | ◀ 1 % |
|      |   | 50    | ◀ 1 % |
| 66   |   | 10;26 | ◀ 1 % |
|      |   | 34;42 | ◀ 5 % |
|      |   | 50    | ◀ 1 % |
| 74   |   | 10    | ◀ 1 % |
|      |   | 26;50 | ◀ 5 % |
| 58   |   | 10    | ◀ 1 % |

### 2.2.2. 3, 3 TE-Reihe

| Tage | ↔ | Tage  | P     |
|------|---|-------|-------|
| 10   |   | 26;34 | ◀ 1 % |
|      |   | 42;50 | ◀ 1 % |
|      |   | 58;66 | ◀ 1 % |
|      |   | 74;82 | ◀ 1 % |
| 34   |   | 82    | ◀ 5 % |

### 2.2.3. 10 TE-Reihe

| Tage | ↔ | Tage  | P     |
|------|---|-------|-------|
| 10   |   | 34;42 | ◀ 1 % |
|      |   | 50;58 | ◀ 1 % |
|      |   | 66;74 | ◀ 1 % |
|      |   | 82    | ◀ 1 % |

## II. Nebenhodenspermatozoen

1. Tab. 25: Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen in der Kontrollreihe und den mit 3,3 TE und 10 TE Procarbazin behandelten Reihen.

| t  | Kontrolle |           |          | 3,3 TE |           |          | 10,0 TE |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|--------|-----------|----------|---------|-----------|----------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n      | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n       | $\bar{x}$ | $\sigma$ |
| 10 | 100       | 9,01      | 9,26     | 100    | 6,18      | 6,39     | 100     | 6,71      | 6,43     |
|    | 100       | 9,50      |          | 15     | 6,60      |          | 100     | 6,15      |          |
| 18 | 100       | 5,78      | 5,60     | 14     | 5,07      | 5,12     | 100     | 5,71      | 5,71     |
|    | 100       | 5,41      |          | 100    | 5,16      |          | ---     | -,--      |          |
| 26 | 12        | 5,00      | 4,99     | 100    | 4,74      | 5,08     | 100     | 4,26      | 4,23     |
|    | 100       | 4,98      |          | 100    | 5,41      |          | 10      | 4,20      |          |
| 34 | 100       | 4,77      | 5,04     | 100    | 3,97      | 4,35     | 12      | 3,91      | 3,96     |
|    | 100       | 5,30      |          | 100    | 4,73      |          | 14      | 4,00      |          |
| 42 | 100       | 4,93      | 4,86     | 16     | 4,87      | 4,90     | 10      | 3,83      | 3,87     |
|    | 100       | 4,79      |          | 100    | 4,93      |          | 53      | 3,90      |          |
| 50 | 100       | 4,98      | 4,85     | 100    | 5,07      | 4,58     | 100     | 3,71      | 3,84     |
|    | 100       | 4,72      |          | 100    | 4,08      |          | 100     | 3,97      |          |
| 58 | 100       | 4,05      | 4,10     | 100    | 4,01      | 3,94     | 100     | 3,84      | 4,13     |
|    | 100       | 4,14      |          | 100    | 3,87      |          | 100     | 4,42      |          |
| 66 | 100       | 4,26      | 4,23     | 100    | 4,55      | 4,48     | 100     | 4,65      | 4,61     |
|    | 100       | 4,19      |          | 100    | 4,40      |          | 100     | 4,56      |          |
| 74 | 100       | 4,89      | 4,97     | 100    | 4,77      | 4,66     | 100     | 4,58      | 4,73     |
|    | 100       | 5,04      |          | 100    | 4,54      |          | 100     | 4,88      |          |
| 82 | 100       | 5,21      | 4,93     | 100    | 4,86      | 4,84     | 100     | 4,74      | 4,51     |
|    | 100       | 4,65      |          | 100    | 4,82      |          | 100     | 4,27      |          |

2. Die mit diesen Ergebnissen durchgeführte Varianzanalyse wies auf signifikante Unterschiede hin:

2.1. Zwischen den Reihen zu jeweils gleichen Zeitpunkten mit  $P < 1 \%$

2.2. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb einer Reihe mit  $P < 1 \%$

2.3. Zwischen den einzelnen Reihen untereinander in ihrem Verlauf mit  $P < 1 \%$

Zur genauen Lokalisation dieser signifikanten Unterschiede wurden die genannten Punkte mit anderen statistischen Tests näher untersucht.

ad 2.1. Geringere Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen der behandelten Reihen gegenüber denen der unbehandelten ließ sich zu mehreren Zeitpunkten mit Hilfe des Tukey-Tests nachweisen.

| t  | K ↔ 10 TE  | K ↔ 3, 3 TE | 3, 3 TE ↔ 10 TE |
|----|------------|-------------|-----------------|
| 10 | $P < 1 \%$ | $P < 1 \%$  | --              |
| 18 | --         | --          | --              |
| 26 | $P < 1 \%$ | --          | $P < 1 \%$      |
| 34 | $P < 1 \%$ | $P < 5 \%$  | --              |
| 42 | $P < 1 \%$ | --          | $P < 1 \%$      |
| 50 | $P < 1 \%$ | --          | $P < 5 \%$      |
| 58 | --         | --          | --              |
| 66 | --         | --          | --              |
| 74 | --         | --          | --              |
| 82 | --         | --          | --              |

ad 2.2. Signifikant unterschiedliche Meßwerte innerhalb einer Reihe wurden mit Hilfe des Tukey-Tests in allen drei Reihen gefunden.

### 2.2.1. Kontrollreihe:

| Tage | ↔ | Tage      | P        |
|------|---|-----------|----------|
| 10   |   | 26 bis 82 | $< 1 \%$ |
| 34   |   | 58        | $< 5 \%$ |

2.2.2. 3,3 TE-Reihe

| Tage | ↔ | Tage      | P     |
|------|---|-----------|-------|
| 10   |   | 26 bis 82 | < 1 % |
| 58   |   | 26;42     | < 5 % |

2.2.3. 10 TE-Reihe

| Tage | ↔ | Tage      | P     |
|------|---|-----------|-------|
| 10   |   | 26 bis 82 | < 1 % |

ad 2.3. Die Parallelitätsprüfung der drei Kurven erfolgte mit dem Scheffé-Test. Es wurde nur auf 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit hin geprüft. Die Prüfung erfolgte bis einschließlich 58. Meßtag, wurde dann auf Grund des offensichtlich parallelen Endverlaufs nicht mehr für notwendig erachtet.

2.3.1. Vergleich der Kontrollkurve mit der 3,3 TE-Kurve

2.3.1.1. Parallelität besteht von Tag — Tag  
26 34

2.3.1.2. Keine Parallelität von Tag — Tag  
10 26

2.3.1.3. Auf Grund der Parallelität der zwei Kurven zwischen 26. und 34. Tag können die zeitlich folgenden Abschnitte ebenfalls als parallel gelten.

2.3.2. Vergleich der 3,3 TE- gegen die 10 TE-Kurve.

Da sich die Kurven vom Aspekt her im fraglichen Zeitraum vom 10. bis 26. Tag als parallel erwiesen, können die zeitlich folgenden Abschnitte ebenfalls als parallel gelten.

### 2.3.3. Vergleich der Kontrollreihe gegen die 3,3 TE-/10 TE-Reihe

2.3.3.1. Keine Parallelität von Tag — Tag  
10 26

2.3.3.2. Der Rest verläuft parallel.

### 2.3.4. Vergleich der 10 TE-Kurve mit der 3,3 TE-/Kontrollkurve

2.3.4.1. Parallelität besteht von Tag — Tag  
26 34  
26;34 42  
26;34;42 50

2.3.4.2. Keine Parallelität von Tag — Tag  
26;34;42;50 58

### III. Vergleich der Meßwerte der Hoden- und Nebenhoden-spermatozoen

Da die gemeinsame Varianzanalyse für Hoden und Nebenhoden signifikante Unterschiede mit  $P < 1 \%$  zwischen der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hoden- und Nebenhodenspermatozoen anzeigte, wurde mit Hilfe des Tukey-Tests näher analysiert.

1. Tab. 26: Vergleich der Meßwerte der Kontrollreihe von Hoden und Nebenhoden

| t  | H. -NH. | P        |
|----|---------|----------|
| 10 | - 2,65  | $< 1 \%$ |
| 18 | 0,85    | $< 5 \%$ |
| 26 | 1,25    | $< 1 \%$ |
| 34 | 0,87    | $< 1 \%$ |
| 42 | 1,04    | $< 1 \%$ |
| 50 | 1,24    | $< 1 \%$ |
| 58 | 1,15    | $< 1 \%$ |
| 66 | 0,55    | --       |
| 74 | 0,06    | --       |
| 82 | 0,27    | --       |

H. -NH. = Meßwerte der Hodenspermatozoen minus  
Meßwerte der Nebenhodenspermatozoen

2. Tab. 27: Vergleich der Meßwerte der 3,3 TE-Reihen von Hoden und Nebenhoden

| t  | H. -NH. | P     |
|----|---------|-------|
| 10 | 0,32    | --    |
| 18 | 0,37    | --    |
| 26 | - 0,21  | --    |
| 34 | 1,11    | < 1 % |
| 42 | 0,44    | --    |
| 50 | 0,59    | < 5 % |
| 58 | 0,78    | < 1 % |
| 66 | 0,04    | --    |
| 74 | - 0,19  | --    |
| 82 | - 0,47  | --    |

3. Tab. 28: Vergleich der Meßwerte der 10 TE-Reihen von Hoden und Nebenhoden

| t  | H. -NH. | P     |
|----|---------|-------|
| 10 | - 0,14  | --    |
| 18 | - 0,26  | --    |
| 26 | 1,10    | < 1 % |
| 34 | 0,89    | < 1 % |
| 42 | 0,83    | < 1 % |
| 50 | 0,47    | --    |
| 58 | 0,50    | --    |
| 66 | - 0,29  | --    |
| 74 | - 0,10  | --    |
| 82 | - 0,16  | --    |

## Varianzanalysen

Ergebnisse der Varianzanalyse bei der Fastgreen-Färbung. Der 18. Tag wurde nicht berücksichtigt.

### 1. Hoden- und Nebenhodenspermatozoen

|                  | SAQ      | FG | MAQ      | F-Wert   | P     |
|------------------|----------|----|----------|----------|-------|
| <u>BD (A, C)</u> | 31,0875  | 27 | 1,1513   | -        |       |
| ACD              | 63,4171  | 16 | 3,9636   | 3,4427   | ◀ 1 % |
| AD               | 73,8576  | 8  | 9,2322   | 8,0189   | ◀ 1 % |
| CD               | 0,8737   | 2  | 0,4368   | 0,3793   | ▶ 5 % |
| D                | 286,0006 | 1  | 286,0006 | 248,4153 | ◀ 1 % |
| <u>B (A, C)</u>  | 61,3959  | 27 | 2,2739   | -        |       |
| AC               | 52,2351  | 16 | 3,2647   | 1,4357   | ▶ 5 % |
| A                | 109,0264 | 8  | 13,6283  | 5,9933   | ◀ 1 % |
| C                | 62,6336  | 2  | 31,3168  | 13,7722  | ◀ 1 % |

A = Zeit, B = Tier, C = Gruppe, D = Lokalisation

### 2. Hodenspermatozoen

|                 | SAQ     | FG | MAQ     | F-Wert  | P     |
|-----------------|---------|----|---------|---------|-------|
| <u>B (A, C)</u> | 19,2854 | 27 | 0,7142  | -       |       |
| AC              | 65,6329 | 16 | 4,1021  | 5,7436  | ◀ 1 % |
| A               | 75,5966 | 8  | 9,4496  | 13,2310 | ◀ 1 % |
| C               | 28,2309 | 2  | 14,1155 | 19,7640 | ◀ 1 % |

3. Nebenhodenspermatozoen

|                 | SAQ      | FG | MAQ     | F-Wert | P     |
|-----------------|----------|----|---------|--------|-------|
| <u>B (A, C)</u> | 73,1979  | 27 | 2,7110  | -      |       |
| AC              | 50,0193  | 16 | 3,1262  | 1,1531 | > 5 % |
| A               | 107,2873 | 8  | 13,4109 | 4,9468 | < 1 % |
| C               | 35,2763  | 2  | 17,6382 | 6,5061 | < 1 % |

4. Partiell-hierarchisches Modell der Varianzanalyse für die  
Meßwerte von Hoden und Nebenhoden vom 18. Tag

|       | SAQ     | FG | MAQ     | F-Wert | P     |
|-------|---------|----|---------|--------|-------|
| C     | 3,9717  | 2  | 1,9858  | 62,32  | < 5 % |
| B (C) | 0,0637  | 2  | 0,0318  | -      |       |
| A     | 24,9956 | 1  | 24,9956 | 26,97  | < 5 % |
| AC    | 1,9512  | 2  | 0,9756  | 1,05   | > 5 % |
| REST  | 1,8531  | 2  | 0,9265  | -      |       |

A = Lokalisation, C = Behandlung bzw. Gruppe

Ergebnisse der Varianzanalyse bei der Sakaguchi-Färbung. Der 18. Tag wurde nicht berücksichtigt.

1. Hoden- und Nebenhodenspermatozoen

|                  | SAQ     | FG | MAQ    | F-Wert  | P     |
|------------------|---------|----|--------|---------|-------|
| <u>BD (A, C)</u> | 2,3667  | 27 | 0,0876 | -       |       |
| ACD              | 7,5372  | 16 | 0,4711 | 5,3778  | < 1 % |
| AD               | 9,2894  | 8  | 1,1612 | 13,2557 | < 1 % |
| CD               | 0,0436  | 2  | 0,0218 | 0,2488  | > 5 % |
| D                | 2,8292  | 1  | 2,8292 | 32,2968 | < 1 % |
| <u>B (A, C)</u>  | 2,5169  | 27 | 0,0932 | -       |       |
| AC               | 6,1342  | 16 | 0,3834 | 4,1137  | < 1 % |
| A                | 55,5047 | 8  | 6,9381 | 74,4431 | < 1 % |
| C                | 11,1269 | 2  | 5,5634 | 59,6931 | < 1 % |

A = Zeit, B = Tier, C = Gruppe, D = Lokalisation

2. Hodenspermatozoen

|                 | SAQ     | FG | MAQ    | F-Wert  | P     |
|-----------------|---------|----|--------|---------|-------|
| <u>B (A, C)</u> | 2,7366  | 27 | 0,1013 | -       |       |
| AC              | 3,2136  | 16 | 0,2009 | 1,9832  | > 5 % |
| A               | 19,4553 | 8  | 2,4319 | 24,0069 | < 1 % |
| C               | 5,8131  | 2  | 2,9065 | 28,6920 | < 1 % |

### 3. Nebenhodenspermatozoen

|                 | SAQ      | FG | MAQ     | F-Wert   | P     |
|-----------------|----------|----|---------|----------|-------|
| <u>B (A, C)</u> | 2, 1470  | 27 | 0, 0795 | -        |       |
| AC              | 10, 4578 | 16 | 0, 6536 | 8, 2213  | < 1 % |
| A               | 45, 3388 | 8  | 5, 6674 | 71, 2880 | < 1 % |
| C               | 5, 3574  | 2  | 2, 6787 | 33, 6943 | < 1 % |

### 4. Partiell-hierarchisches Modell der Varianzanalyse für Meßwerte von Hoden und Nebenhoden vom 18. Tag

|       | SAQ     | FG | MAQ     | F-Wert | P     |
|-------|---------|----|---------|--------|-------|
| C     | 0, 7765 | 2  | 0, 3882 | 11, 05 | > 5 % |
| B (C) | 0, 0702 | 2  | 0, 0351 | -      |       |
| A     | 0, 3204 | 1  | 0, 3204 | 33, 50 | < 5 % |
| AC    | 0, 2793 | 2  | 0, 1396 | 14, 60 | > 5 % |
| REST  | 0, 0191 | 2  | 0, 0095 | -      |       |

A = Lokalisation, C = Behandlung bzw. Gruppe

# CYTOPHOTOMETRIE II

## Naphthol-Yellow-Färbung für Gesamtproteine

### I. Hoden

1. Tabelle 29: Durchschnittswerte der 3 Versuchsreihen  
(insgesamt 5424 Spermatozoen)

| t  | Kontrolle |           |          | 3, 3 TE |           |          | 10, 0 TE |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|---------|-----------|----------|----------|-----------|----------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n       | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n        | $\bar{x}$ | $\sigma$ |
| 10 | 100       | 10,38     | 10,79    | 32      | 10,75     | 10,67    | 100      | 11,42     | 11,06    |
|    | 100       | 11,20     |          | 22      | 10,59     |          | 100      | 10,69     |          |
| 18 | 100       | 9,88      | 10,02    | 100     | 8,32      | 8,59     | 100      | 8,91      | 8,91     |
|    | 100       | 10,15     |          | 100     | 8,86      |          | ---      | -, --     |          |
| 26 | 100       | 9,08      | 9,70     | 100     | 9,37      | 9,31     | 100      | 9,48      | 9,15     |
|    | 100       | 10,32     |          | 100     | 9,24      |          | 100      | 8,81      |          |
| 34 | 100       | 9,47      | 9,75     | 100     | 8,91      | 8,87     | 13       | 10,00     | 9,51     |
|    | 100       | 10,02     |          | 36      | 8,83      |          | 46       | 9,02      |          |
| 42 | 100       | 7,96      | 8,75     | 100     | 8,59      | 8,60     | 76       | 8,59      | 8,31     |
|    | 100       | 9,53      |          | 100     | 8,60      |          | 100      | 8,03      |          |
| 50 | 69        | 10,68     | 9,96     | 100     | 10,57     | 10,12    | 100      | 7,73      | 8,20     |
|    | 100       | 9,23      |          | 100     | 9,66      |          | 100      | 8,66      |          |
| 58 | 100       | 9,24      | 8,77     | 30      | 9,57      | 9,76     | 100      | 10,52     | 9,98     |
|    | 100       | 8,30      |          | 100     | 9,95      |          | 100      | 9,44      |          |
| 66 | 100       | 9,28      | 8,89     | 100     | 7,87      | 8,15     | 100      | 8,61      | 9,05     |
|    | 100       | 8,50      |          | 100     | 8,42      |          | 100      | 9,49      |          |
| 74 | 100       | 8,12      | 8,14     | 100     | 8,26      | 9,28     | 100      | 9,61      | 9,12     |
|    | 100       | 8,16      |          | 100     | 10,30     |          | 100      | 8,63      |          |
| 82 | 100       | 9,11      | 9,52     | 100     | 10,39     | 8,56     | 100      | 9,47      | 9,51     |
|    | 100       | 9,92      |          | 100     | 6,72      |          | 100      | 9,55      |          |

2. Bei der Varianzanalyse gab es signifikante Unterschiede

2.1. zwischen den Versuchsreihen zu gleichen Zeitpunkten:  
keine;

2.2. zwischen den Zeitpunkten jeweils einer Kurve:  
 $P < 1 \%$ ;

2.3. zwischen den 3 Kurven: keine, d.h. diese verlaufen parallel.

ad 2.2. Auf Grund des TUKEY - Tests waren folgende Zeitunterschiede signifikant:

2.2.1.

Kontrolle

| Tage ↔ Tage |      | P        |
|-------------|------|----------|
| 10          | - 74 | $< 5 \%$ |

2.2.2.

3,3 TE

keine Signifikanzen

2.2.3.

10,0 TE

|    |      |          |
|----|------|----------|
| 10 | - 42 | $< 5 \%$ |
|    | - 50 | $< 5 \%$ |

## II. Nebenhoden

1. Tabelle 30: Durchschnittswerte der 3 Versuchsreihen  
(insgesamt 5336 Spermatozoen)

| t  | Kontrolle  |                |             | 3, 3 TE    |                |             | 10, 0 TE   |                |             |
|----|------------|----------------|-------------|------------|----------------|-------------|------------|----------------|-------------|
|    | n          | $\bar{x}'$     | $\emptyset$ | n          | $\bar{x}$      | $\emptyset$ | n          | $\bar{x}$      | $\emptyset$ |
| 10 | 100<br>50  | 12,64<br>12,92 | 12,78       | 100<br>18  | 11,76<br>10,22 | 10,99       | 100<br>100 | 12,17<br>10,36 | 11,27       |
| 18 | 100<br>100 | 10,17<br>9,04  | 9,61        | 100<br>100 | 7,34<br>8,62   | 7,98        | 100<br>--- | 6,97<br>-,--   | 6,97        |
| 26 | 100<br>23  | 10,97<br>8,43  | 9,70        | 100<br>100 | 7,41<br>8,63   | 8,02        | 100<br>10  | 9,01<br>8,80   | 8,91        |
| 34 | 100<br>100 | 9,07<br>10,75  | 9,91        | 100<br>100 | 10,85<br>10,40 | 10,63       | 11<br>14   | 9,00<br>8,87   | 8,94        |
| 42 | 100<br>100 | 12,11<br>10,79 | 11,45       | 100<br>100 | 8,17<br>9,13   | 8,65        | 10<br>100  | 10,20<br>10,86 | 10,53       |
| 50 | 100<br>100 | 7,97<br>11,36  | 9,67        | 100<br>100 | 9,89<br>10,22  | 10,06       | 100<br>100 | 10,68<br>9,89  | 10,29       |
| 58 | 100<br>100 | 9,67<br>10,61  | 10,14       | 100<br>100 | 11,58<br>10,01 | 10,80       | 100<br>100 | 9,68<br>11,26  | 10,47       |
| 66 | 100<br>100 | 8,26<br>9,91   | 9,09        | 100<br>100 | 7,86<br>8,96   | 8,41        | 100<br>100 | 10,56<br>8,78  | 9,67        |
| 74 | 100<br>100 | 9,05<br>9,56   | 9,31        | 100<br>100 | 9,62<br>10,75  | 10,19       | 100<br>100 | 9,45<br>9,84   | 9,65        |
| 82 | 100<br>100 | 9,69<br>8,89   | 9,29        | 100<br>100 | 10,63<br>11,08 | 10,86       | 100<br>100 | 8,82<br>10,03  | 9,43        |

2. Signifikante Abweichungen wurden per Varianzanalyse erfaßt
- 2.1. zwischen den Versuchsreihen zu gleichen Zeitpunkten:  
keine;
- 2.2. zwischen den Zeitpunkten jeweils einer Kurve:  
 $P < 1 \%$ ;
- 2.3. zwischen den 3 Kurven: keine, d.h. diese verlaufen parallel.

ad 2.2. Mit dem TUKEY - Test wurden folgende signifikanten Zeitunterschiede ermittelt:

2.2.1.

Kontrolle

| <u>Tage ↔ Tage</u> |          | <u>P</u> |
|--------------------|----------|----------|
| 10 - 66            | $< 5 \%$ |          |
| - 74               | $< 5 \%$ |          |
| - 82               | $< 5 \%$ |          |

2.2.2.

3,3 TE

keine Signifikanzen

2.2.3.

10,0 TE

keine Signifikanzen

### III. Vergleich Hoden / Nebenhoden

Die gemeinsame Varianzanalyse erbrachte wie schon bei der Feulgen - Färbung für DNS einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Organen ( $P < 1 \%$ ). Der TUKEY - Test prüfte wieder die einzelnen signifikanten Werte:

| Tage            | Kontrolle |             | 3,3 TE |             | 10,0 TE |             |
|-----------------|-----------|-------------|--------|-------------|---------|-------------|
|                 | H.-NH.    | P           | H.-NH. | P           | H. NH.  | P           |
| 10              | -1,99     | $\leq 5 \%$ | -0,32  | --          | -0,21   | --          |
| 18 <sup>+</sup> | 0,41      | --          | 0,61   | --          | 1,94    | --          |
| 26              | 0,00      | --          | 1,29   | --          | 0,24    | --          |
| 34              | -0,16     | --          | -1,76  | $\leq 5 \%$ | 0,57    | --          |
| 42              | -2,70     | $\leq 1 \%$ | -0,05  | --          | -2,22   | $\leq 1 \%$ |
| 50              | 0,29      | --          | 0,06   | --          | -2,09   | $\leq 1 \%$ |
| 58              | -1,37     | --          | -1,04  | --          | -0,49   | --          |
| 66              | -0,20     | --          | -0,26  | --          | -0,62   | --          |
| 74              | -1,17     | --          | -0,91  | --          | -0,53   | --          |
| 82              | 0,23      | --          | -2,30  | $\leq 1 \%$ | 0,08    | --          |

H.-NH. = Differenz: Hoden minus Nebenhoden

+ Die Irrtumswahrscheinlichkeit für den 18. Tag wurde mit dem SCHEFFE - Test ermittelt (s. Varianzanalyse 18. Tag).

# Feulgenfärbung für DNS

## I. Hoden

1. Tabelle 31: Durchschnittswerte der 3 Versuchsreihen  
(insgesamt 5744 Spermatozoen)

| t  | Kontrolle |           |          | 3, 3 TE |           |          | 10, 0 TE |           |          |
|----|-----------|-----------|----------|---------|-----------|----------|----------|-----------|----------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n       | $\bar{x}$ | $\sigma$ | n        | $\bar{x}$ | $\sigma$ |
| 10 | 100       | 10,36     | 10,17    | 100     | 10,45     | 10,28    | 100      | 10,65     | 10,34    |
|    | 100       | 9,98      |          | 100     | 10,11     |          | 100      | 10,02     |          |
| 18 | 100       | 11,29     | 11,45    | 100     | 12,14     | 12,15    | 100      | 9,30      | 9,30     |
|    | 100       | 11,61     |          | 100     | 12,16     |          | ---      | -, --     |          |
| 26 | 100       | 10,62     | 9,72     | 100     | 9,45      | 9,23     | 100      | 7,46      | 8,87     |
|    | 100       | 8,82      |          | 100     | 9,00      |          | 100      | 10,27     |          |
| 34 | 100       | 11,45     | 11,35    | 100     | 11,38     | 11,38    | 22       | 10,72     | 11,23    |
|    | 100       | 11,24     |          | 100     | 11,38     |          | 22       | 11,73     |          |
| 42 | 100       | 10,66     | 11,05    | 100     | 11,83     | 11,83    | 100      | 10,98     | 11,81    |
|    | 100       | 11,43     |          | 100     | 11,82     |          | 100      | 12,64     |          |
| 50 | 100       | 10,92     | 11,28    | 100     | 11,03     | 11,48    | 100      | 12,69     | 12,85    |
|    | 100       | 11,63     |          | 100     | 11,92     |          | 100      | 13,01     |          |
| 58 | 100       | 13,44     | 13,30    | 100     | 12,00     | 11,68    | 100      | 12,42     | 12,27    |
|    | 100       | 13,15     |          | 100     | 11,35     |          | 100      | 12,11     |          |
| 66 | 100       | 12,13     | 12,00    | 100     | 11,95     | 12,20    | 100      | 12,10     | 12,18    |
|    | 100       | 11,86     |          | 100     | 12,45     |          | 100      | 12,25     |          |
| 74 | 100       | 13,02     | 12,64    | 100     | 12,99     | 12,57    | 100      | 12,38     | 11,44    |
|    | 100       | 12,26     |          | 100     | 12,15     |          | 100      | 10,50     |          |
| 82 | 100       | 11,98     | 10,54    | 100     | 10,03     | 9,51     | 100      | 10,88     | 10,95    |
|    | 100       | 9,10      |          | 100     | 8,99      |          | 100      | 11,01     |          |

2. Bei der Varianzanalyse für Hoden ergaben sich signifikante Unterschiede

2.1. zwischen den Versuchsreihen zu gleichen Zeitpunkten:  
keine;

2.2. zwischen den Zeitpunkten jeweils einer Kurve:  
 $P < 1 \%$ ;

2.3. zwischen den 3 Kurven (Kontrolle, 3,3 TE, 10,0 TE):  
keine, d.h. diese verlaufen parallel.

ad 2.2. Die folgenden signifikanten Zeitunterschiede ermittelten wir mit Hilfe des TUKEY - Tests:

2.2.1.

| <u>Kontrolle</u> |   |    |         |
|------------------|---|----|---------|
| Tage ↔ Tage      |   |    | P       |
| 26               | - | 58 | $<1 \%$ |
|                  | - | 74 | $<5 \%$ |
| 58               | - | 10 | $<1 \%$ |
|                  | - | 82 | $<5 \%$ |

2.2.2.

| <u>3,3 TE</u> |   |    |         |
|---------------|---|----|---------|
| 26            | - | 42 | $<5 \%$ |
|               | - | 66 | $<5 \%$ |
|               | - | 74 | $<1 \%$ |
| 82            | - | 66 | $<5 \%$ |
|               | - | 74 | $<1 \%$ |

2.2.3.

10,0 TE

| Tage ↔ Tage |      | P    |
|-------------|------|------|
| 26          | - 42 | ◀5 % |
|             | - 50 | ◀1 % |
|             | - 58 | ◀1 % |
|             | - 66 | ◀1 % |
|             | - 74 | ◀5 % |

## II. Nebenhoden

1. Tabelle 32: Durchschnittswerte der 3 Versuchsreihen  
(insgesamt 5546 Spermatozoen)

| t  | Kontrolle |           |             | 3, 3 TE |           |             | 10, 0 TE |           |             |
|----|-----------|-----------|-------------|---------|-----------|-------------|----------|-----------|-------------|
|    | n         | $\bar{x}$ | $\emptyset$ | n       | $\bar{x}$ | $\emptyset$ | n        | $\bar{x}$ | $\emptyset$ |
| 10 | 100       | 11,39     | 9,23        | 100     | 6,95      | 7,23        | 100      | 9,19      | 9,38        |
|    | 100       | 7,06      |             | 100     | 7,50      |             | 100      | 9,57      |             |
| 18 | 100       | 9,77      | 10,25       | 100     | 9,52      | 10,02       | 100      | 8,54      | 8,54        |
|    | 100       | 10,73     |             | 100     | 10,52     |             | ---      | -, --     |             |
| 26 | 100       | 7,89      | 8,01        | 100     | 7,46      | 7,83        | 100      | 10,88     | 10,54       |
|    | 100       | 8,12      |             | 100     | 8,19      |             | 10       | 10,20     |             |
| 34 | 100       | 8,38      | 8,17        | 100     | 7,05      | 7,09        | 12       | 9,75      | 10,50       |
|    | 100       | 7,95      |             | 100     | 7,13      |             | 12       | 11,25     |             |
| 42 | 100       | 10,06     | 9,37        | 100     | 8,68      | 8,57        | 12       | 11,00     | 10,40       |
|    | 100       | 8,67      |             | 100     | 8,46      |             | 100      | 9,80      |             |
| 50 | 100       | 9,15      | 9,14        | 100     | 12,41     | 11,16       | 100      | 9,45      | 9,05        |
|    | 100       | 9,13      |             | 100     | 9,90      |             | 100      | 8,64      |             |
| 58 | 100       | 12,68     | 12,37       | 100     | 11,14     | 11,18       | 100      | 8,78      | 9,04        |
|    | 100       | 12,05     |             | 100     | 11,21     |             | 100      | 9,29      |             |
| 66 | 100       | 10,88     | 9,98        | 100     | 9,35      | 9,46        | 100      | 10,74     | 10,75       |
|    | 100       | 9,07      |             | 100     | 9,57      |             | 100      | 10,76     |             |
| 74 | 100       | 8,35      | 9,45        | 100     | 9,72      | 8,58        | 100      | 10,09     | 11,55       |
|    | 100       | 10,55     |             | 100     | 7,43      |             | 100      | 13,01     |             |
| 82 | 100       | 10,74     | 9,85        | 100     | 8,80      | 9,08        | 100      | 10,11     | 9,92        |
|    | 100       | 8,96      |             | 100     | 9,36      |             | 100      | 9,72      |             |

2. Die Varianzanalyse für Nebenhoden brachte signifikante Unterschiede

2.1. zwischen den Versuchsreihen zu gleichen Zeitpunkten:

$P < 1 \%$ ;

2.2. zwischen den Zeitpunkten jeweils einer Kurve:

$P < 5 \%$

2.3. zwischen den 3 Kurven:  $P < 5 \%$

ad 2.1. Die einzelnen signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsreihen wurden ebenfalls mit dem TUKEY - Test aufgeschlüsselt

| Tage | K. ↔ 10,0 TE | K. ↔ 3,3, TE | 3,3 TE ↔ 10,0 TE |
|------|--------------|--------------|------------------|
| 10   | ----         | ----         | ----             |
| 18   | ----         | ----         | -----            |
| 26   | ----         | ----         | $P < 5 \%$       |
| 34   | ----         | ----         | $P < 1 \%$       |
| 42   | ----         | ----         | ----             |
| 50   | ----         | ----         | ----             |
| 58   | $P < 1 \%$   | ----         | ----             |
| 66   | ----         | ----         | ----             |
| 74   | ----         | ----         | $P < 1 \%$       |
| 82   | ----         | ----         | ----             |

ad 2.2. Die zeitlich signifikanten Abweichungen wurden mit dem TUKEY - Test ermittelt:

2.2.1.

| <u>Kontrolle</u>   |   |    |          |
|--------------------|---|----|----------|
| <u>Tage ↔ Tage</u> |   |    | <u>P</u> |
| 58                 | - | 26 | ◀1 %     |
|                    | - | 34 | ◀1 %     |

2.2.2.

| <u>3,3 TE</u> |   |    |      |
|---------------|---|----|------|
| 10            | - | 50 | ◀5 % |
|               | - | 58 | ◀5 % |
| 34            | - | 50 | ◀1 % |
|               | - | 58 | ◀1 % |

2.2.3.

10,0 TE  
keine Signifikanzen

ad 2.3. Die Parallelitätsprüfung der 3 Kurven erfolgte mit dem SCHEFFE - Test:

a. Vergleich Kontrolle - 3,3 TE:

.Die beiden Kurven verlaufen statistisch gesehen parallel.

b. Vergleich Kontrolle/3,3 TE - 10,0 TE:

Die 10,0 TE - Kurve zeigt zwischen folgenden Zeitpunkten Parallelitätsabweichungen: zwischen dem 42. und 50. Tag und zwischen dem 58. und 66. Tag.

### III. Vergleich Hoden / Nebenhoden

Die gemeinsame Varianzanalyse für Hoden und Nebenhoden verdeutlichte einen hoch signifikanten Unterschied ( $P < 1 \%$ ) zwischen beiden Lokalisationen; daraufhin wurden die Differenzwerte ebenfalls mit dem TUKEY - Test auf Signifikanz überprüft:

| Tage | Kontrolle |      | 3,3 TE  |      | 10,0 TE |      |
|------|-----------|------|---------|------|---------|------|
|      | H. -NH.   | P    | H. -NH. | P    | H. -NH. | P    |
| 10   | 0,94      | --   | 3,05    | <1 % | 0,96    | --   |
| 18   | 1,25      | --   | 2,13    | <5 % | 0,76    | --   |
| 26   | 1,71      | --   | 1,40    | --   | -1,67   | --   |
| 34   | 3,18      | <1 % | 4,29    | <1 % | 0,73    | --   |
| 42   | 1,68      | --   | 3,26    | <1 % | 1,41    | --   |
| 50   | 2,14      | <5 % | 0,31    | --   | 3,80    | <1 % |
| 58   | 0,93      | --   | 0,50    | --   | 3,23    | <1 % |
| 66   | 2,02      | <5 % | 2,74    | <1 % | 1,43    | --   |
| 74   | 3,19      | <1 % | 3,99    | <1 % | -0,11   | --   |
| 82   | 0,69      | --   | 0,43    | --   | 1,03    | --   |

H. -NH. = Differenz: Hoden minus Nebenhoden

## Varianzanalysen

### Naphthol-Yellow-Färbung

#### I. Gemeinsame Varianzanalyse für Hoden und Nebenhoden

Für die statistische Auswertung der Meßergebnisse wurde eine Varianzanalyse mit 4 Faktoren durchgeführt (Zeit (9); Tier (2); Reihe (3); Lokalisation (2)).

Da am 18. Tag in der 10 TE - Reihe ein Meßwert wegen totaler Aspermie fehlte, mußte der gesamte Meßtag aus der Varianzanalyse fortfallen.

Tab. 33: Ergebnisse der gemeinsamen Varianzanalyse

|                     | SAQ         | FG     | MAQ        | F-Wert  | P     |
|---------------------|-------------|--------|------------|---------|-------|
| <u>BD (A, C)</u>    | 16,7007     | 27     | 0,6185     | -       |       |
| ACD                 | 17,6792     | 16     | 1,1050     | 1,7865  | ► 5 % |
| AD                  | 8,0195      | 8      | 1,0024     | 1,6206  | ► 5 % |
| CD                  | 0,2407      | 2      | 0,1204     | 0,1946  | ► 5 % |
| D                   | 11,4987     | 1      | 11,4987    | 18,5912 | ◄ 1 % |
| <br><u>B (A, C)</u> | <br>24,9146 | <br>27 | <br>0,9227 | <br>-   |       |
| AC                  | 16,4367     | 16     | 1,0273     | 1,1133  | ► 5 % |
| A                   | 45,6309     | 8      | 5,7039     | 6,1817  | ◄ 1 % |
| C                   | 0,7972      | 2      | 0,3986     | 0,4319  | ► 5 % |

A = Zeit; B = Tier; C = Reihe; D = Lokalisation

II. Da die Varianzanalyse für Hoden / Nebenhoden einen hoch signifikanten Lokalisationsunterschied anzeigte, wurden für Hoden und Nebenhoden je eine getrennte Varianzanalyse durchgeführt.

Tab. 34: Ergebnisse der Varianzanalyse für Hoden

|                 | SAQ     | FG | MAQ    | F-Wert | P     |
|-----------------|---------|----|--------|--------|-------|
| <u>B (A, C)</u> | 17,1062 | 27 | 0,6335 | -      |       |
| AC              | 11,2751 | 16 | 0,7047 | 1,1123 | ► 5 % |
| A               | 21,4760 | 8  | 2,6845 | 4,2375 | ◄ 1 % |
| C               | 0,1029  | 2  | 0,0514 | 0,0811 | ► 5 % |

Tab. 35: Ergebnisse der Varianzanalyse für Nebenhoden

|                 | SAQ     | FG | MAQ    | F-Wert | P     |
|-----------------|---------|----|--------|--------|-------|
| <u>B (A, C)</u> | 24,5090 | 27 | 0,9077 | -      |       |
| AC              | 22,8408 | 16 | 1,4275 | 1,5726 | ► 5 % |
| A               | 32,1744 | 8  | 4,0218 | 4,4307 | ◄ 1 % |
| C               | 0,9350  | 2  | 0,4675 | 0,5150 | ► 5 % |

A = Zeit; B = Tier; C = Reihe

**Varianzanalyse 18. Tag**  
**Naphthol-Yellow-Färbung**

Für den 18. Tag wurde eine gesonderte Varianzanalyse mit 3 Faktoren (Reihe, Tier, Lokalisation) nach dem partiell-hierarchischen Modell durchgeführt, da 1 Meßwert aus der 10 TE - Reihe wegen totaler Aspermie fehlte.

Tab. 36: Ergebnisse der Varianzanalyse für den 18. Tag

|       | SAQ    | FG | MAQ    | F-Wert | P  |
|-------|--------|----|--------|--------|----|
| C     | 6,6137 | 2  | 3,3068 | 6,52   | -- |
| A     | 1,5840 | 1  | 1,5840 | 5,05   | -- |
| AC    | 0,8379 | 2  | 0,4189 | 1,33   | -- |
| B (C) | 1,0130 | 2  | 0,5065 |        |    |
| REST  | 0,6269 | 2  | 0,3134 |        |    |

A = Lokalisation; B = Tier; C = Reihe

# Varianzanalyse Feulgenfärbung

## I. Gemeinsame Varianzanalyse für Hoden und Nebenhoden

Zur Aufschlüsselung der Meßergebnisse wurde eine Varianzanalyse mit 4 Faktoren durchgeführt (Zeit (9); Tier (2); Reihe (3); Lokalisation (2)).

Da am 18. Tag in der 10 TE - Reihe nur 1 Wert vorlag (der andere Wert konnte mangels Spermien nicht ermittelt werden), konnte der ganze Meßtag in der Varianzanalyse nicht berücksichtigt werden.

Tab. 37: Ergebnisse der gemeinsamen Varianzanalyse

|                  | SAQ     | FG | MAQ     | F-Wert  | P     |
|------------------|---------|----|---------|---------|-------|
| <u>BD (A, C)</u> | 23,8422 | 27 | 0,8830  | -       |       |
| ACD              | 34,7224 | 16 | 2,1701  | 2,4576  | ◀ 5 % |
| AD               | 13,2231 | 8  | 1,6529  | 1,8719  | ▶ 5 % |
| CD               | 4,7816  | 2  | 2,3908  | 2,7075  | ▶ 5 % |
| D                | 82,7575 | 1  | 82,7575 | 93,7231 | ◀ 1 % |
| <u>B (A, C)</u>  | 22,2798 | 27 | 0,8251  | -       |       |
| AC               | 22,1879 | 16 | 1,3867  | 1,6806  | ▶ 5 % |
| A                | 69,4780 | 8  | 8,6847  | 10,5256 | ◀ 1 % |
| C                | 9,0643  | 2  | 4,5321  | 5,4927  | ◀ 1 % |

A = Zeit; B = Tier; C = Reihe; D = Lokalisation

II. Die Varianzanalyse für Hoden / Nebenhoden brachte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen beiden Organen; es wurde daher noch je eine getrennte Varianzanalyse angeschlossen.

Tab. 38: Ergebnisse der Varianzanalyse für Hoden

|                 | SAQ     | FG | MAQ    | F-Wert  | P    |
|-----------------|---------|----|--------|---------|------|
| <u>B (A, C)</u> | 16,4751 | 27 | 0,6101 | -       |      |
| AC              | 10,7634 | 16 | 0,6727 | 1,1026  | ➤5 % |
| A               | 55,6061 | 8  | 6,9508 | 11,3928 | ⚡1 % |
| C               | 0,4977  | 2  | 0,2489 | 0,4079  | ➤5 % |

Tab. 39: Ergebnisse der Varianzanalyse für Nebenhoden

|                 | SAQ     | FG | MAQ    | F-Wert | P    |
|-----------------|---------|----|--------|--------|------|
| <u>B (A, C)</u> | 29,6469 | 27 | 1,0979 | -      |      |
| AC              | 46,1468 | 16 | 2,8842 | 2,6270 | ⚡5 % |
| A               | 27,0950 | 8  | 3,3869 | 3,0848 | ⚡5 % |
| C               | 13,3482 | 2  | 6,6741 | 6,0789 | ⚡1 % |

A = Zeit; B = Tier; C = Reihe

Varianzanalyse 18. Tag  
Feulgenfärbung

Für den 18. Tag wurde eine eigene Varianzanalyse mit 3 Faktoren (Reihe, Tier, Lokalisation) nach dem partiell-hierarchischen Modell durchgeführt, da ein Meßwert aus der 10 TE - Reihe wegen totaler Aspermie fehlte.

Tab. 40: Ergebnisse der Varianzanalyse für den 18. Tag

|       | SAQ    | FG | MAQ    | F-Wert | P     |
|-------|--------|----|--------|--------|-------|
| C     | 6,8180 | 2  | 3,4090 | 10,18  | --    |
| A     | 5,5056 | 1  | 5,5056 | 32,14  | ≤ 5 % |
| AC    | 0,7600 | 2  | 0,3800 | 2,21   | --    |
| B (C) | 0,6697 | 2  | 0,3348 |        |       |
| REST  | 0,3425 | 2  | 0,1712 |        |       |

A = Lokalisation; B = Tier; C = Reihe

# REPRODUKTIONSVERSUCH

Tab. 41: Ergebnisse des 1. Reproduktionsversuchs

## 1. Reproduktionsversuch

| Tage | Kontrolle      |             |      | 3,3 TE         |              |      | 10,0 TE        |             |      |
|------|----------------|-------------|------|----------------|--------------|------|----------------|-------------|------|
|      | Wurf-<br>größe | davon +     | Ø    | Wurf-<br>größe | davon +      | Ø    | Wurf-<br>größe | davon +     | Ø    |
| 10   | 14<br>9        | 0           | 11,5 | 9<br>10        | 0            | 9,5  | 0<br>4         | 0<br>0      | 2,0  |
| 18   | --<br>--       | -<br>-      | --,- | 11<br>10       | 0<br>0       | 10,5 | 8<br>0         | 0<br>0      | 4,0  |
| 26   | 13<br>10       | 0<br>0      | 11,5 | 16<br>0        | 7<br>0       | 8,0  | 0<br>0         | 0<br>0      | 0,0  |
| 34   | --<br>--       | -<br>-      | --,- | 0<br>14        | 0<br>0       | 7,0  | 0<br>0         | 0<br>0      | 0,0  |
| 42   | 12<br>12       | 2<br>0      | 12,0 | 0<br>12        | 0<br>0       | 6,0  | 6<br>0         | 0<br>0      | 3,0  |
| 50   | --<br>--       | -<br>-      | --,- | --<br>--       | -<br>-       | --,- | --<br>--       | -<br>-      | --,- |
| 58   | 12<br>13<br>-- | 0<br>0<br>- | 12,5 | 14<br>12<br>15 | 3<br>2<br>1  | 13,7 | 0<br>12<br>13  | 0<br>0<br>0 | 7,7  |
| 66   | --<br>--<br>-- | -<br>-<br>- | --,- | --<br>--<br>-- | -<br>-<br>-  | --,- | --<br>--<br>-- | -<br>-<br>- | --,- |
| 74   | 10<br>13<br>-- | 0<br>2<br>- | 11,5 | 11<br>13<br>14 | 0<br>0<br>14 | 12,7 | 13<br>10<br>15 | 1<br>2<br>0 | 12,7 |
| 82   | --<br>--<br>-- | -<br>-<br>- | --,- | --<br>--<br>-- | -<br>-<br>-  | --,- | --<br>--<br>-- | -<br>-<br>- | --,- |

Tab. 42: Ergebnisse des 2. Reproduktionsversuchs

2. Reproduktionsversuch

| Tage | Kontrolle      |             |      | 3,3 TE         |              |      | 10,0 TE        |             |      |
|------|----------------|-------------|------|----------------|--------------|------|----------------|-------------|------|
|      | Wurf-<br>größe | davon +     | Ø    | Wurf-<br>größe | davon +      | Ø    | Wurf-<br>größe | davon +     | Ø    |
| 10   | --             | -           | --,- | --             | -            | --,- | --             | -           | --,- |
| 18   | 12<br>6        | 1<br>6      | 9,0  | 0<br>12        | 0<br>0       | 6,0  | 5<br>8         | 0<br>0      | 6,5  |
| 26   | --             | -           | --,- | 3<br>11        | 1<br>0       | 7,0  | 0<br>0         | 0<br>0      | 0,0  |
| 34   | 12<br>12       | 0<br>0      | 12,0 | 0<br>14        | 0<br>0       | 7,0  | 0<br>0         | 0<br>0      | 0,0  |
| 42   | --             | -           | --,- | 13<br>6        | 0<br>0       | 9,5  | 0<br>0         | 0<br>0      | 0,0  |
| 50   | 9<br>17        | 3<br>6      | 13,0 | 8<br>14        | 1<br>0       | 11,0 | 11<br>7        | 11<br>7     | 9,0  |
| 58   | --             | -           | --,- | --             | -            | --,- | --             | -           | --,- |
| 66   | 13<br>11<br>-- | 0<br>0<br>- | 12,0 | 15<br>0<br>15  | 15<br>0<br>0 | 10,0 | 9<br>12<br>13  | 9<br>2<br>0 | 11,3 |
| 74   | --             | -           | --,- | --             | -            | --,- | --             | -           | --,- |
| 82   | 15<br>6<br>--  | 8<br>0<br>- | 10,5 | 10<br>0<br>8   | 0<br>0<br>0  | 6,0  | 13<br>10<br>16 | 0<br>0<br>0 | 13,0 |

Die im 1. und 2. Reproduktionsversuch gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests untersucht. Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede in der Größe der Nachkommenschaft der 3 Versuchsreihen zu jeweils gleichen Zeitpunkten:

| t  | K. -10 TE | K. -3, 3, TE | 3, 3 TE-10 TE |
|----|-----------|--------------|---------------|
| 10 | P < 0,1 % | ----         | P < 1 %       |
| 18 | ----      | ----         | ----          |
| 26 | P < 0,1 % | ----         | P < 0,1 %     |
| 34 | P < 0,1 % | P < 5 %      | P < 0,1 %     |
| 42 | P < 0,1 % | ----         | P < 0,1 %     |
| 50 | ----      | ----         | ----          |
| 58 | ----      | ----         | P < 5 %       |
| 66 | ----      | ----         | ----          |
| 74 | ----      | ----         | ----          |
| 82 | ----      | ----         | P < 1 %       |

Um Unterschiede zwischen der Anzahl der Nachkommen derselben Böcke in 1. oder 2. Reproduktion zu ermitteln, wurde ebenfalls der  $\chi^2$ -Test angewandt. In der Kontrollreihe und der 3,3 TE - Reihe fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Die 10 TE-Reihe dagegen wies folgende Unterschiede zwischen 1. und 2. Reproduktion auf:

| t       |         | Ges. -Nachkommen |         | P     |
|---------|---------|------------------|---------|-------|
| 1. Rep. | 2. Rep. | 1. Rep.          | 2. Rep. |       |
| 10      | 18      | 4                | 13      | < 5 % |
| 18      | 26      | 8                | 0       | < 1 % |
| 26      | 34      | 0                | 0       | --    |
| 34      | 42      | 0                | 0       | --    |
| 42      | 50      | 6                | 18      | < 5 % |
| 50      | 58      | ---              | --      | --    |
| 58      | 66      | 25               | 34      | --    |
| 66      | 74      | --               | --      | --    |
| 74      | 82      | 38               | 39      | --    |

### Fertilitätsversuch der F<sub>1</sub>-Generation

Um eventuelle Schäden bei der F<sub>1</sub>-Generation der behandelten Reihen festzustellen, wurden die Nachkommen der Tiere der 3,3 TE - Reihe wie auch der 10 TE - Reihe untereinander gepaart. Dabei wurden die Nachkommen bewußt aus der Zeit der reduzierten Wurfgrößen gewählt. Als Kontrolle dienten gleichaltrige Nachkommen der ursprünglichen Kontrolltiere.

|           | F <sub>1</sub> -Kontrolle | F <sub>1</sub> -3,3 TE | F <sub>1</sub> -10 TE |
|-----------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| Ø -       |                           |                        |                       |
| Wurfgröße | 11,4                      | 10,4                   | 11,9                  |
| Paarungen | 10                        | 10                     | 10                    |

### Sterilitätskontrolle

Um auszuschließen, daß bei der Reproduktion die 0 - Würfe auf einer Sterilität der Weibchen basierte, wurde eine Sterilitätskontrolle dieser Weibchen mit Männchen der Kontrollreihe durchgeführt, die ihre Zeugungsfähigkeit schon unter Beweis gestellt hatten. Dabei warfen alle Weibchen, und die Zahl der Nachkommen lag im Normbereich: Sie betrug im Durchschnitt 11,56 Junge pro Wurf.

# RELATIVE HODENGEWICHTE

Tab. 43: Relative Hodengewichte der für die Cytophotometrie und Histologie verwendeten Tiere

| Tage | <u>Relative Hodengewichte</u> |      |                               |      |                               |      |
|------|-------------------------------|------|-------------------------------|------|-------------------------------|------|
|      | Kontrolle                     |      | 3,3 TE                        |      | 10,0 TE                       |      |
|      | rel. Ho-<br>dengew.<br>(mg/g) | ø    | rel. Ho-<br>dengew.<br>(mg/g) | ø    | rel. Ho-<br>dengew.<br>(mg/g) | ø    |
| 10   | 2,14                          | 2,23 | 2,72                          | 2,03 | 2,18                          | 2,52 |
|      | 2,32                          |      | 1,33                          |      | 2,86                          |      |
| 18   | 2,69                          | 2,74 | 2,08                          | 2,02 | 2,32                          | 1,67 |
|      | 2,79                          |      | 1,95                          |      | 1,01                          |      |
| 26   | 2,46                          | 2,39 | 1,72                          | 2,19 | 2,01                          | 1,64 |
|      | 2,32                          |      | 2,65                          |      | 1,27                          |      |
| 34   | 2,64                          | 2,40 | 2,16                          | 2,55 | 2,20                          | 1,96 |
|      | 2,16                          |      | 2,93                          |      | 1,72                          |      |
| 42   | 3,82                          | 3,07 | 2,48                          | 2,49 | 2,46                          | 2,37 |
|      | 2,32                          |      | 2,50                          |      | 2,28                          |      |
| 50   | 2,36                          | 2,39 | 2,65                          | 2,57 | 3,05                          | 2,62 |
|      | 2,42                          |      | 2,49                          |      | 2,18                          |      |
| 58   | 2,92                          | 2,87 | 1,75                          | 2,28 | 2,60                          | 2,41 |
|      | 2,82                          |      | 2,80                          |      | 2,21                          |      |
| 66   | 3,06                          | 3,20 | 2,81                          | 2,96 | 2,08                          | 2,21 |
|      | 3,34                          |      | 3,10                          |      | 2,33                          |      |
| 74   | 2,73                          | 2,53 | 3,10                          | 2,95 | 2,78                          | 2,83 |
|      | 2,32                          |      | 2,79                          |      | 2,88                          |      |
| 82   | 2,31                          | 2,16 | 2,82                          | 2,72 | 2,43                          | 2,78 |
|      | 2,01                          |      | 2,62                          |      | 3,12                          |      |

Der Vergleich der relativen Hodengewichte in der Varianzanalyse ergab keinerlei signifikante Unterschiede.

Varianzanalyse

|          | SAQ       | FG | MAQ     | F-Wert |
|----------|-----------|----|---------|--------|
| B (A, C) | 1191,9800 | 30 | 39,7327 | --     |
| AC       | 793,3370  | 18 | 44,0743 | 1,1093 |
| A        | 545,9440  | 9  | 60,6604 | 1,5267 |
| C        | 31,5730   | 2  | 15,7865 | 0,3973 |

## BESPRECHUNG UND DISKUSSION

### HISTOLOGIE

#### Grundlagen: Spermatogenese

Die Spermatogenese der Maus durchläuft von der A<sub>1</sub>-Spg bis zur reifen Spermatozoe vier Spermatogenesezyklen und benötigt dafür annähernd 35 Tage (Clermont et al., 1969, Oakberg, 1956b). Leblond und Clermont definierten 1952 den Zyklus als die Serie der Veränderungen, die sich zwischen zwei aufeinanderfolgenden Auftritten derselben Zellassoziatioin in einem Tubulusgebiet ereignen, und unterteilten ihn bei der Ratte in 14 Stadien. Als Kriterium ihrer Stadieneinteilung benutzten sie die Entwicklung des Golgi-Apparats der Spt über die Kopfkappe bis hin zum Akrosom. Diese Strukturen sind PAS-anfärbbar und zeigen von Stadium zu Stadium charakteristische Veränderungen. Da die Spermatogenese zwischen den einzelnen Zellgenerationen synchronisiert abläuft, befinden sich Spt, Spz und Spg stets im selben Stadium.

Oakberg übertrug 1956 (a) das Prinzip dieser Stadieneinteilung auf die Maus und gelangte dabei zu 12 Stadien.

Zeitliche Beschreibungen der Spermatogenese liegen von Oakberg (1956b) und Clermont et al. (1969) vor. Sie stimmen in den Werten für die Gesamtdauer eines Zyklus mit 8,63 bzw. 8,62 Tagen für die C<sub>3</sub>H-Maus (8,88 Tage für die Swiss white-Maus) überein, während die Angaben für die Längen der einzelnen Stadien gelegentlich deutlicher voneinander abweichen.

Die räumliche Ausdehnung eines Stadiums im Verlauf eines Tubulus (Segment) kann innerhalb eines Stadiums und zwischen den Stadien erheblich schwanken. Perey et al. gaben 1961 für die Ratte die Durchschnittswerte der einzelnen Segmente differierend von 0,4 bis 3,2 mm an. Die Verteilung der Stadien erfolgt vom Rete testis aus

deszendierend, d.h. ein proximales Segment irgendeines Stadiums wird - bis auf seltene Ausnahmen, die sog. Modulationen - distalwärts von dem Segment des nächst niedrigeren Stadiums gefolgt, so daß eine absteigende Sequenz - eine Welle - zustande kommt (Perey et al., 1961, Hochereau, 1963).

Der Ablauf der Spermatogenese beginnt bei der Maus im Stadium IX mit der Teilung der  $A_1$ - zu den  $A_2$ -Spg, die sich im Stadium XI zu  $A_3$ -Spg teilen. Im Stadium I (des nächsten Zyklus) erfolgt die Mitose zu  $A_4$ -, im späten Stadium II die zu den Im- und im Stadium IV die zu den B-Spg. Im Stadium VI teilen sich diese zu den Resting (R) Spz, die im Stadium VIII in die meiotische Prophase eintreten. Diese Prophase erstreckt sich über 16 Stadien bis zum Stadium XII des folgenden Zyklus, in dem sich die beiden Reifeteilungen vollziehen. Die dadurch entstehenden Spt reifen über 20 Stadien bis zum Stadium VIII des übernächsten Zyklus anfangs als runde, später als elongierte Spt zu Spermatozoen heran, die nun das Tubulussystem des Hoden verlassen (Oakberg, 1956a, Monesi, 1962, Hilscher et al., 1966, Hilscher, 1967, Clermont et al, 1968).

Die Frage der Stammzell-Erneuerung - also der Entstehung einer ausreichenden Menge an  $A_1$ -Spg für die Teilung im Stadium IX - ist noch nicht endgültig geklärt.

De Rooij et al. (1968a,b) und Clermont et al. (1968) beschrieben eine Entstehung von  $A_1$ -Spg gleichzeitig mit der der Im-Spg aus  $A_4$ -Spg.

Hilscher (1967) und Hilscher und Makoski (1968) dagegen meinten, der Weg von  $A_4$ - zu  $A_1$ -Spg ginge über eine Zwischenstufe von  $A_5$ -Spg.

Oakberg (1971, bei der Maus) und Huckins (1971, bei der Ratte) schließlich nannten die bisher für Reservestammzellen gehaltenen  $A_0$ -Spg als die eigentlichen Stammzellen ( $A_s$ -Spg), die im Laufe eines Zyklus von einzelnen Zellen zu Paaren und danach zu Ketten

proliferieren und sich (bei der Maus in den Stadien II bis VIII) zu  $A_1$ -Spg transformieren.

Eine Festlegung auf einen dieser Mechanismen kann hier nicht erfolgen. Immerhin bleibt festzustellen, daß die Befunde von Hilscher und de Rooij et al., die zu deren Interpretationen geführt haben, auch mit denen von Oakberg und Huckins vereinbar erscheinen.

### Spermatogenese:

Die in den Tab. 2 bis 4b angegebenen Werte sind davon abhängig, daß 1. die ausgezählten Tubuli repräsentativ für den ganzen Hoden sind - die Tab. 6 - 8 belegen die Übereinstimmung zwischen den Spermatogenesedefekten der ausgezählten Tubuli und den für die jeweiligen Entnahmetage charakteristischen Defekten -, daß 2. die einzelnen Stadien korrekt bestimmt worden sind - diese Bedingung ist erfüllt, weil die von Oakberg (1956a) angegebenen Kriterien eine recht scharfe Trennung der Stadien ermöglichen, weil die gefundenen Zellanzahlen den stadiencharakteristischen Häufigkeiten entsprechen und weil die Häufigkeit der einzelnen Stadien in den drei Reihen annähernd übereinstimmen - und daß 3. die einzelnen Zellen richtig erkannt worden sind - eine Verwechslungsmöglichkeit besteht praktisch nur für die Generationen der A-Spg, aber diese wurden stadienentsprechend eingestuft, und  $A_0$ -/ $A_S$ -Spg wurden demgemäß nicht gesondert erfaßt.

In Tab. 2 sind für die ausgezählten Stadien der Kontrollreihe die je Tubulusquerschnitt vorhandenen Zellen aufgeführt. Oakberg (1956a) gab 2,14 "dormant" A-Spg (=  $A_1$ -Spg) für die Stadien IV bis VIII an und blieb damit unter dem hier gefundenen Wert von 2,61. Die anschließende Proliferation zeigt jedoch deutliche Übereinstimmung. In unserem Versuch stieg die Spg-Anzahl von den  $A_1$ - im Gesamtdurchschnitt zu den Im- und  $A_1$ -Spg in Stadium III auf den 6,29-

fachen Wert an - bei Oakberg auf den 6,02-fachen -; die durchschnittlich 54,33 Spz proliferierten zu 150,07 runden Spt, also auf den 2,76-fachen Wert - bei Oakberg auf den 2,99-fachen. Daraus folgt, daß bei gleichem Proliferationsmodus die Degenerationsrate mit der von Oakberg gefundenen übereinstimmen muß und also die Kontrolltiere dieses Versuchs keinen zusätzlichen spermatogenesewirksamen Einflüssen ausgesetzt waren.

Fig. 1 vergleicht als Zusammenstellung von Einzeldiagrammen die 10,0 TE-Reihe innerhalb der Entnahmetage (= Zeilen) und Stadien (= Spalten) mit dem Gesamtdurchschnitt der Kontrollreihe über die ersten sechs Entnahmetage.

Aus den Diagrammen der ersten beiden Entnahmetage geht die Information über die empfindlichen Zellgenerationen hervor. Diese Tatsache beruht auf der Möglichkeit, mit den von Oakberg (1956b) und Clermont et al. (1969) angegebenen Werten für die Dauer der einzelnen Stadien gleichsam im Rückblick die Zellgenerationen zu bestimmen, die zum Zeitpunkt jeder Injektion vorgelegen haben müssen.

Die Fig. 2 und 3 benutzen dieses Prinzip. Ihre horizontalen Linien stehen maßstabsgetreu (nach Oakberg, 1956b) für den gesamten Spermatogeneseverlauf von der Entstehung der A<sub>1</sub>-Spg im späten Stadium II bis zu den reifen Spermatozoen mehr als vier Zyklen später gegen Ende des Stadiums VIII. Die Übergänge von der einen zur anderen Zellgeneration wurden als in der Mitte der Stadien liegend angenommen, in denen die entsprechenden Teilungen stattfinden. Die Linien beschreiben den Entwicklungsweg zu den rechts angegebenen, am 10. bzw. 18. Tag nach Behandlungsbeginn ausgezählten Zellen, deren Anzahl wieder in % des Kontrollwertes angegeben und hochsignifikante Unterschiede mit <sup>++</sup> gekennzeichnet sind.

Bezogen auf diesen Entwicklungsweg sind die Injektionszeitpunkte für die einzelnen Zellgenerationen des 10. bzw. 18. Tages durch

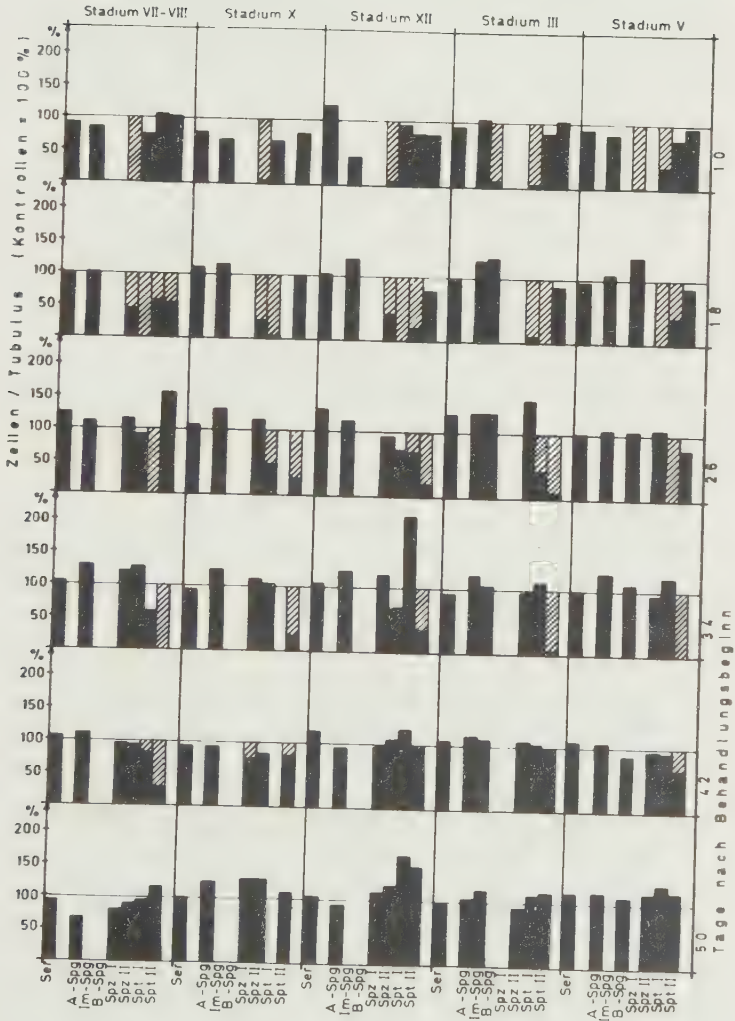


Fig. 1: Tagesdurchschnitte der je Tubulus und Stadium in der 10,0 TE-Reihe vorhandenen Zellen (schwarze Säulen) bezogen auf den Gesamtdurchschnitt der Kontrollreihe; hochsignifikante Differenzen zu den Tagesdurchschnitten der Kontrollreihe schraffiert

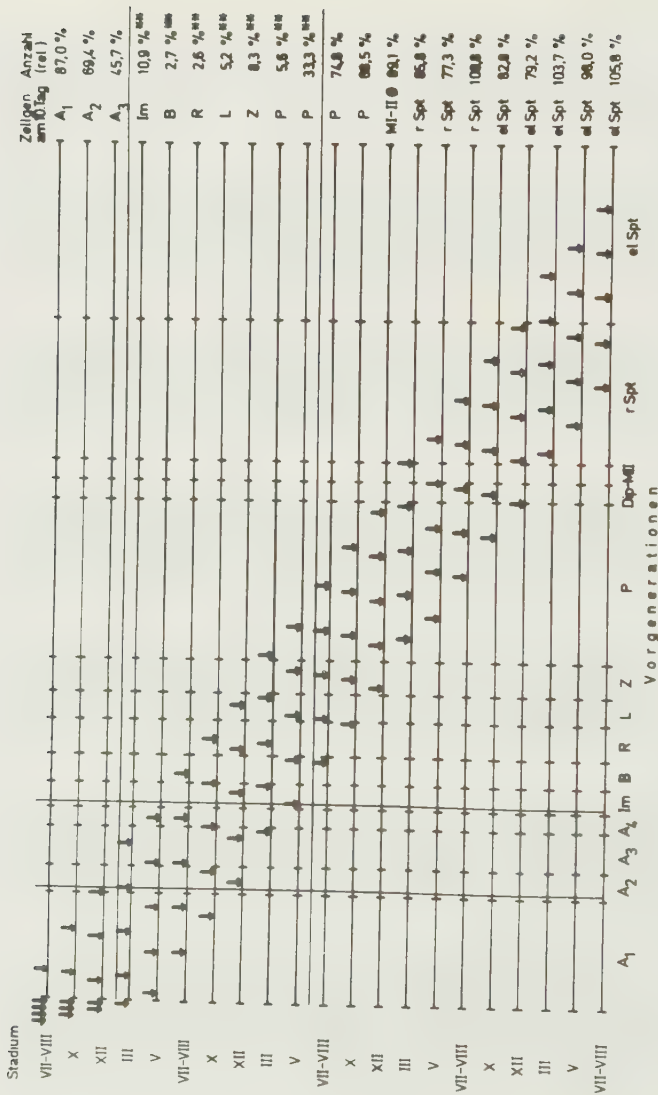


Fig. 2: procarbacinempfindliche Zellgenerationen: vorhandene Zellen am 10. Tag, Ausmaß ihrer Verminderung (hochsignif. gegen Kontrollen: ++ ) und auf ihren Entwicklungsweg bezogen die Injektionszeitpunkte (Pfeile)



Pfeile gekennzeichnet. Dadurch wird kenntlich, welche Vorgenerationen während der Injektionen vorgelegen haben.

Die Genauigkeit dieser Befunde wird dadurch eingeschränkt, daß einerseits die Bestimmung des Spermatogenesestandes an den Entnahmetagen durch die Einteilung in Stadien nur eine Differenzierung in etwa 20-Stunden-Abschnitte erlaubt und daß andererseits Procarbacin und seine Metabolite nicht nur zum Zeitpunkt der Applikation wirksam sind.

Geht man nun davon aus, daß zu einer Schädigung der Spermatogenese mindestens eine Injektion notwendig ist, so stellen sich für die hochsignifikant verminderten Zellgenerationen (horizontale Markierungslinien) die zwischen den beiden vertikalen Markierungslinien auftretenden Vorgenerationen als procarbacinempfindliche Bereiche heraus.

Am 10. Tag wurde die linke Markierungslinie durch den zweiten Pfeil gezogen, weil eine Injektion zu der Verminderung der Im-Spg auf 10,9 % sicher nicht ausreicht und außerdem die zygotänen Spz am 18. Tag als (näherungsweise) Folgegeneration der  $A_3$ -Spg des 10. Tages hochsignifikant reduziert sind, so daß eine - wenn auch statistisch nicht zu sichernde - Verringerung der  $A_3$ -Spg angenommen werden darf.

Somit ergibt sich ein empfindlicher Bereich von den  $A_2$ - bis zu den Im-Spg.

Am 18. Tag ist dieser Bereich von den späten  $A_1$ -Spg bis zu den frühen R-Spz eingezeichnet. Allerdings ist die Verminderung der runden Spt in Stadium VII-VIII nicht unbedingt verlässlich, weil nur ein Tier diesen Spt-Mangel aufwies, während für das andere normale Zahlen gefunden wurden. Das gleiche gilt für den Schwund der elongierten Spt in denselben Tubuli.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Befunden dieser beiden Ent-

nahmetage für die 10,0 TE-Reihe ein procarbacinempfindlicher Spermatogenesebereich sicher von den  $A_2$ - bis zu den Im-Spg. Wahrscheinlich aber sprechen zusätzlich späte  $A_1$ - und frühe B-Spg, wenn auch weniger stark, auf diese Procarbacinbehandlung an. Spz und Spt zeigten dagegen ein hohes Maß an Resistenz.

Die Darlegungen von Oakberg (1971) und Huckins (1971) über die Entstehung von  $A_1$ - aus  $A_S$ -Spg in den Stadien II-VIII können in diesem Zusammenhang bedeuten, daß die vordere Grenze vom unempfindlichen zum empfindlichen Bereich zwischen  $A_S$ - und  $A_1$ -Spg liegt.

Das gleiche Ergebnis wird auch dann erreicht, wenn statt der von Oakberg angegebenen Werte für die Dauer der einzelnen Stadien die von Clermont et al. (1969) zugrunde gelegt werden. Entscheidender Grund dafür ist, daß beide Autoren übereinstimmende Angaben für die Zyklusdauer machen und die Abstände zwischen den Entnahmetagen unseres Versuchs dieser Zyklusdauer nahe kommen.

Der hier beobachtete empfindliche Bereich steht in weitgehender Übereinstimmung mit den von Hilscher und Reichelt (1968) bei der Ratte erhobenen Befunden.

Auch gegenüber anderen Zytostatika wie dem Cyclophosphamid (Hilscher und Reichelt, 1968) und dem Busulfan (Partington et al., 1964, de Rooij et al., 1968b) sind A- und Im-Spg als besonders empfindlich beschrieben worden.

Das Ausmaß der Schädigung ist offenbar von der Anzahl der Injektionen abhängig, die in den empfindlichen Bereich fallen (Fig. 2 u. 3). Eine Injektion bewirkt demnach eine Verminderung der Zellen auf ca. 40 %, während bei zwei Injektionen der Effekt wesentlich verstärkt wird und vier bis fünf Injektionen einen praktisch vollständigen Verlust der angegriffenen Zellgeneration herbeiführen.

Mindestens 80 % aller Tubuli sind von diesen Procarbacinwirkungen betroffen. Tab. 8 beschreibt das Schädigungsausmaß auf der Ebene des gesamten Hodens, indem sie die Zahlen der Tubuli mit intakter und - nach Defekten aufgeschlüsselt - beeinträchtigter Spermatogenese angibt. Weil aber die einzelnen Tubuli bei diesem Untersuchungsgang nicht durch Auszählen der vorhandenen Zellen, sondern nach dem Aspekt beurteilt wurden, dürften geringgradig defekte Tubuli gelegentlich der Erfassung entgangen sein, so daß der Grad der Schädigung die angegebenen Werte noch übersteigt.

In den betroffenen Tubuli setzen die am 10. Tag wenig oder nicht verminderten Spt und pachytänen Spz an den folgenden Entnahmetagen ihre Spermatogenese fort und verlassen spätestens nach dem 26. Tag als Spermatozoen ohne morphologisch erkennbaren Defekt die Tubuli (vgl. Fig. 1).

Dementsprechend wandert das Schädigungsmaximum (schraffiert) im Sinne des angelsächsischen Begriffs der "maturation depletion" von der ersten Spz-Lage am 10. Tag über die zweite Lage am 18. Tag und die der runden Spt am 26. Tag bis es am 34. Tag die Schicht der elongierten Spt erreicht (Abb. 2 - 5).

Darunter beginnt die Regeneration. Ihr erster, noch unvollständiger Schub wird am 18. Tag im Stadium VII-VIII als R-Spz sichtbar. Auch er wandert von Entnahmetag zu Entnahmetag (also näherungsweise von Zyklus zu Zyklus) um eine Zellschicht lumenwärts, bis am 42. Tag die ersten regenerierten langen Spt wieder registriert werden. Der zweite Regenerationsschub erreicht bereits den Kontrollwert und übertrifft ihn sogar in den meisten Fällen.

Auch diese, an Einzeltubuli erhobenen Befunde stimmen mit denen der Tab. 8 überein.

Aus Tab. 3 geht hervor, daß in der 3,3 TE-Reihe nur am 18. Tag eine weniger ausgeprägte Schädigung vorlag, die nach ihrer Lokali-

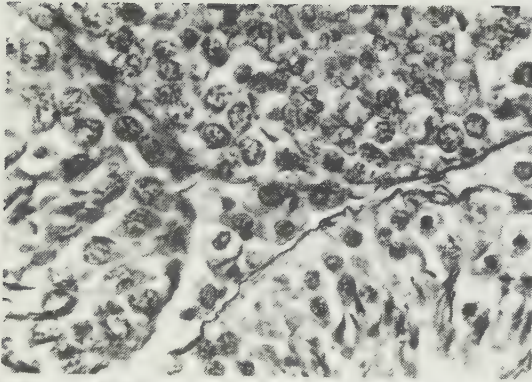


Abb. 2:  
10. Tag;  
Stadien IX, XI, XII;  
leptot. u. zygot.  
Spz fehlen

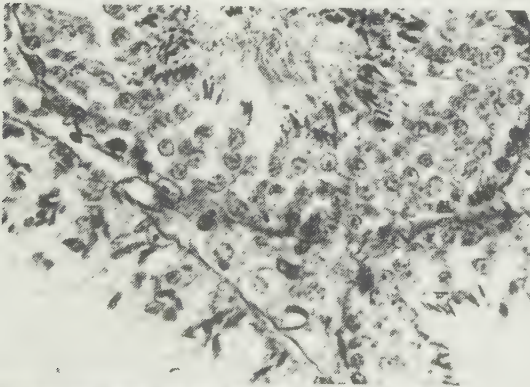


Abb. 3:  
18. Tag;  
Stadien VI, VII, X;  
zygot. u. pachyt.  
Spz fehlen

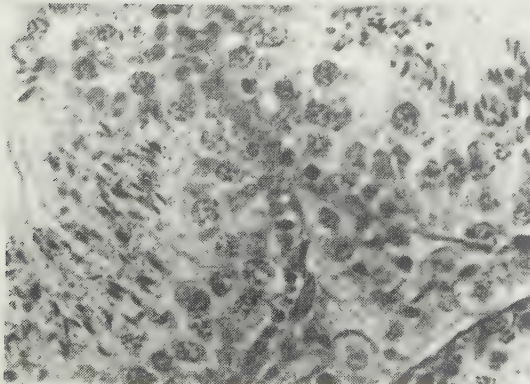


Abb. 4:  
26. Tag;  
Stadium VII-VIII;  
runde Spt fehlen

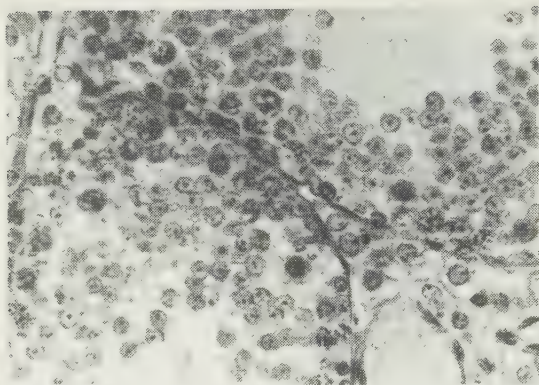


Abb. 5:  
34. Tag;  
Stadien V, VI;  
elong. Spt fehlen

sation mit der der 10,0 TE-Reihe übereinstimmte. Dementsprechend zeigt Tab. 7 ein Bild nur gering gegenüber den Kontrollen verstärkter, diffus verteilter Defekte. Die Dosis von 3,3 TE liegt also offensichtlich an der Grenze zur histologischen Schädigung.

In allen drei Reihen wurde jeweils ein Tier gefunden, das im Ausmaß seiner Spermatogenesedefekte deutlich die anderen Tiere der eigenen Reihe übertraf: nach Na Cl und 10,0 TE am 18. Tag, nach 3,3 TE am 74. Tag. Diese Tiere mögen entweder per se eine gestörte Spermatogenese gehabt haben oder im Falle der procarbacinbehandelten Tiere auf eine individuell unterschiedliche Empfindlichkeit hinweisen.

Die Beobachtung vermehrter  $A_0$ -Spg in der 10,0 TE-Reihe vom 18. bis 34. Tag befindet sich in Übereinstimmung mit den Angaben von de Rooij (1970), der nach Myleran eine Zunahme dieser Zellen feststellte. Er beschrieb sie als Spg mit stärker granuliertem Chromatin und einer oder mehreren Vakuolen im Kern.

Abb. 6 zeigt einen Tubulus im Stadium III mit einer  $A_1$ -, einer Im- und zwei (wahrscheinlich prophasischen)  $A_0$ -Spg. Auch hier scheinen Kernvakuolen vorhanden zu sein.

Wenn Oakberg (1971) und Huckins (1971) die  $A_o$ -Spg als eigentliche Stammzellen ( $A_s$ -Spg) beschrieben haben, so muß das nicht unbedingt im Widerspruch zu der auch hier vermuteten Reservefunktion stehen. Vielmehr scheinen diese beiden Funktionen sehr wohl miteinander vereinbar zu sein.

Die geringen Unterschiede in der Häufigkeit von Degenerationen zwischen den drei Reihen läßt keinen Schluß auf die Wirkungsweise des Procarbamins auf die empfindlichen Zellgenerationen zu. Hilscher und Reichelt beobachteten 1968 einen Zelluntergang von A- und Im-Spg in der späten Interphase und frühen Prophase nach einer Schädigung während der späten  $G_1$ - und der S-Phase. Demnach sind Degenerationen zehn Tage nach der ersten und zwei Tage nach der letzten Injektion allenfalls noch im Bereich der A-Spg zu erwarten (vgl. Fig. 2), aber dort fallen sie wegen der geringen Zahl nicht auf.

Die einmalige Zunahme von Zelluntergängen am 18. Tag nach 10,0 TE im Bereich der Spt ist möglicherweise auf eine Schädigung kurz vor oder während der Meiose zurückzuführen (vgl. Fig. 3).

Riesenzellen sind in Tubuli contorti nach den verschiedensten Noxen beschrieben worden: nach Jod- oder Alkoholinjektionen, thermischen oder mechanischen Schädigungen, Östrogengabe, A- oder B-Avitaminose, Ligation der samenableitenden Wege, ionisierender Strahlung (Ellis et al., 1969), dl-Ethionin (Goldberg et al., 1959, Benson et al., 1966), Procarbacin (Hilscher und Reichelt, 1968), Ischämie (Harrison, 1956), Venenunterbindung (Hundeiker, 1970), Fluoroacetamid (Mazzanti et al., 1964). Daraus folgt, daß die Entstehung von Riesenzellen im Keimepithel eine allgemeine Reaktionsnorm auf höchst vielfältige Reize darstellt.

Nach 3,3 und 10,0 TE Procarbacin traten zwei Formen mehr-

kerniger Zellen auf: solche mit Kernen pachytäner Spz und solche mit Kernen degenerierender Spt.

Die Beobachtung von "Riesen-Spz" mit bis zu vier Metaphaseplatten (Abb. 7), die sich synchron zu den normal erscheinenden Spz in einem Stadium XII-Tubulus in Teilung befinden, weist darauf hin, daß mehrkernige Spz ein offenbar normal koordiniertes, aber pathologisch-mehrpoliges Teilungsverhalten bewahren können und daß möglicherweise die Spt-Riesenzellen (Abb. 8) über mehrpolige Mitosen ohne Zytoplasmateilung aus Spz-Riesenzellen hervorgegangen sind.

Abb. 8 zeigt eine sich einschnürende Spt-Riesenzelle, deren beide Hälften durch eine breite Zytoplasmabrücke verbunden sind und die die typische, ringförmige Anordnung der Kerne noch erhalten zeigt. Da es sich hier wegen der deutlichen Kernkonfiguration nur um eine einzelne Zelle handeln kann, haben allem Anschein nach selbst solche Spt-Riesenzellen noch eine (anomale Teilungs-) Aktivität.

Die Existenz dieser Riesenzellen und besonders ihr abnormes Teilungsverhalten sind als Ausdruck gestörter zellulärer Steuerungsmechanismen zu werten. Ihr Auftreten auch über einen Spermatogenesezyklus nach Behandlungsende hinaus zeigt, daß mit einiger Wahrscheinlichkeit selbst die Stammzellen genetisch nicht völlig resistent gegenüber Procarbacin sind, das schon wegen seines Metabolits Formaldehyd den Verdacht auf Mutagenität erwecken muß (Röhrborn, 1965a).

Für zahlreiche andere Zytostatika und Röntgenstrahlen sind detaillierte Angaben über ihren zellulären genetischen Angriffspunkt bei der Maus und/oder bei Drosophila gemacht worden (Röhrborn, 1965a, b, 1964, Fahmy et al. 1969, Pomerantseva et al., 1969). Demnach wirken Sulfonsäureester, Äthylenimine und Röntgenstrahlen besonders mutagen auf Spt, weniger auf Spz und praktisch nicht auf Spg, während Melphalan seine stärkste Mutagenität bei Spg

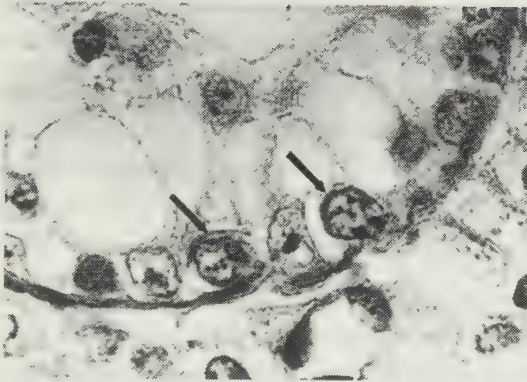


Abb. 6:  
Stadium III-Tubulus  
2 A<sub>0</sub>-Spg (Pfeile)  
1 A<sub>1</sub>-, 1 Im-Spg  
18. Tag

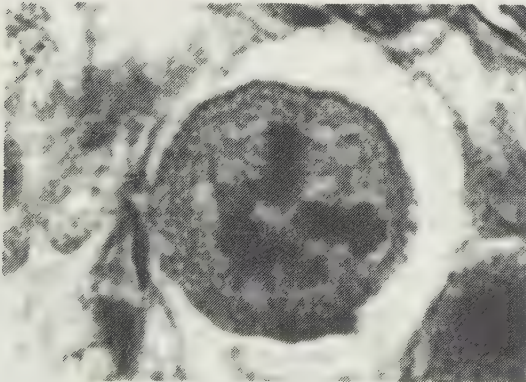


Abb. 7:  
dreipolige Mitose  
einer Spz-Riesen-  
zelle

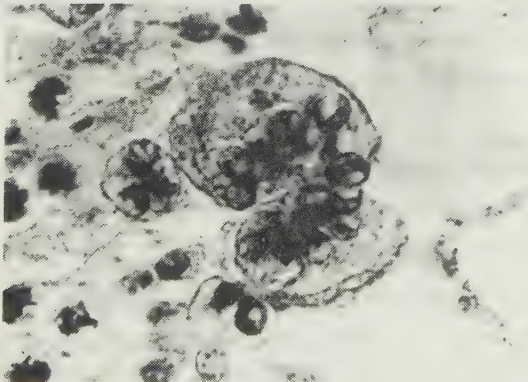


Abb. 8:  
Spz-Riesenzelle  
mit Einschnürung

zeigt. Wo Procarbacin in diesem Zusammenhang einzureihen ist, kann natürlich nicht mit Hilfe von Riesenzellen beurteilt werden.

Bei Änderungen der Spermatogenesekinetik - soweit sie den gesamten Ablauf nicht in völlig gleichem Maße betreffen, sondern sich in Form einer Verlängerung oder Verkürzung bestimmter Spermatogeneseabschnitte ausdrücken - ist zu erwarten, daß einige Stadien entsprechend häufiger oder seltener anzutreffen sind.

Tab. 9 zeigt eine recht gute Übereinstimmung der Häufigkeiten der 12 Stadien in allen drei Reihen und legt damit den Schluß nahe, daß die Spermatogenesekinetik durch die Procarbacinbehandlung nicht beeinträchtigt worden ist.

Jedoch muß diese Annahme dadurch in Zweifel gezogen werden, daß benachbart liegende Tubuli häufiger, als es der Existenz von 12 Stadien und der Tubulusanordnung entspricht, im selben Stadium vorgefunden werden (vgl. hierzu Abschnitt "intertubuläre Stadienkoordination"), weil damit bei der Stadienbestimmung in benachbarten Tubuli keine strenge Zufälligkeit mehr gewährleistet ist.

Die Tubulusdurchmesser (Fig. 4) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Reihen. Für die 10,0 TE-Reihe immerhin wird deutlich, daß der Durchmesser am 18. Tag mit  $145,6 \mu$  auch statistisch gesichert kleiner ist als die meisten übrigen dieser Reihe. Er ist wahrscheinlich ebenso wie die folgenden, allmählich wieder ansteigenden Tubulusdurchmesser wegen der zeitlichen Übereinstimmung auf den Mangel an Spermatogenesezellen zurückzuführen.

Die Tubuluswand reagierte auf 10,0 TE Procarbacin vom 18. bis 34. Tag mit einer hochsignifikanten bzw. signifikanten Dickenzunahme im Vergleich zu den Kontrollen und der 3,3 TE-Reihe.

Sie bietet durch ihre wechselnde Stärke große Gelegenheit zur subjektiven Beeinflussung der Werte. Da jedoch die Tagesdurch-

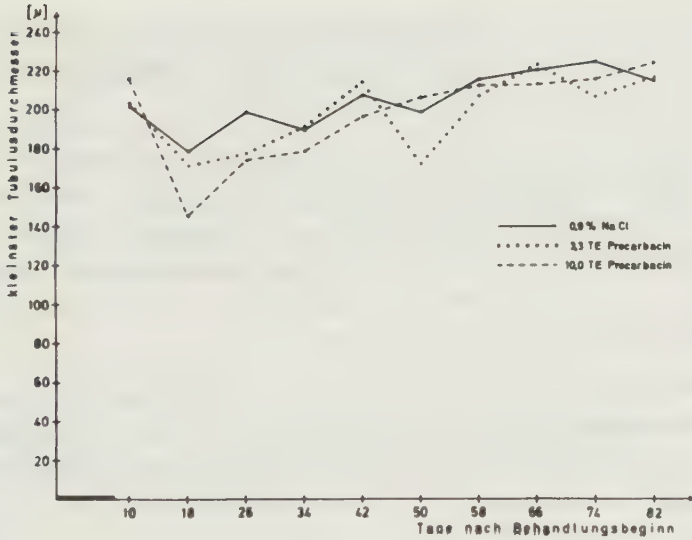


Fig. 4: kleinster Tubulusdurchmesser  
(verstärkter Bereich der Abszisse = Behandlungszeitraum)

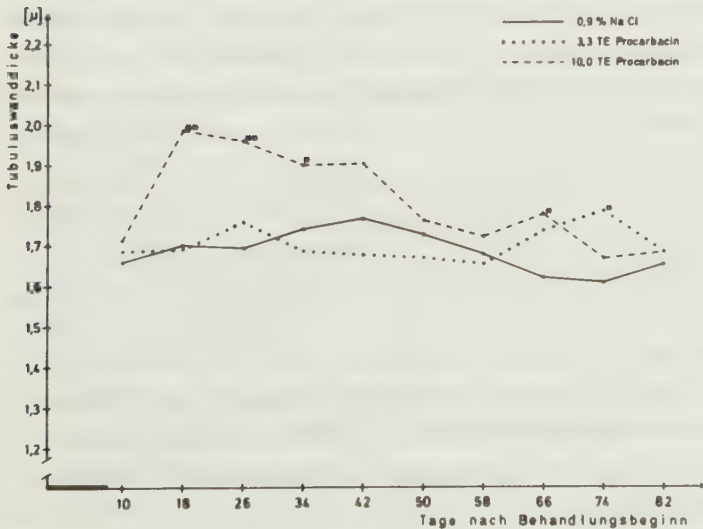


Fig. 5: Tubuluswanddicke  
(Unterschiede gegen Kontrollen signifikant: +, hochsignifikant ++; Behandlungszeitraum auf Abszisse verstärkt)

schnitte auf jeweils 100 Einzelmessungen beruhen und die Meßpunkte in bewußtem Streben nach objektiver Auswahl festgelegt wurden, dürfen die Ergebnisse als repräsentativ gelten.

Die Tubuluswandverdickung trat gleichzeitig mit der Leydigzellhyperplasie und der Hypervaskularisation (s.u.) auf und verzögert gegenüber der Spermatogenesestörung. Die Hypervaskularisation kann jedoch nicht Ausdruck eines direkten Zusammenhanges sein, weil sie auch nach 3,3 TE zu beobachten ist, dort aber nicht von einer verdickten Tubuluswand begleitet wird.

Nur einmal, am 74. Tag, unterscheidet sich die Tubuluswand der 3,3 TE-Reihe signifikant von dem Kontrollwert, und an eben diesem Tag ist auch die einzige deutliche Spermatogenesestörung dieser Reihe zu registrieren.

Pierce et al. (1968, 1969) deuten Verbreiterungen epithelialer Basalmembranen als Reaktion auf verschiedenartige Schädigungen der Epithelzellen. Sie beschreiben starke Zunahmen der Basalmembrandurchmesser und Fältelung in den Hoden der Maus nach Bestrahlung (mit 5000 r), nach Injektion von Potassium-Permanganat und nach künstlicher Infektion mit Tuberkelbazillen - in allen Fällen verbunden mit Tubulusatrophie -, in Adenokarzinomen nach Bestrahlung und bei Aminonucleosid-Nephrosen. Idänpään-Heikkilä (1966) beschrieb eine starke Fältelung der inneren, nicht zellulären Lage der Tubuluswand der Ratte und Umorganisierung der kollagenen Fibrillen schon fünf Tage nach lokaler Hitzeapplikation. Courot et al. (1970) berichten von einer Reaktion der Tubuluswand auf Einflüsse wie Hypophysektomie und Hitze in Form von Verdrehung der verschiedenen Lagen, die damit zum Eindruck einer Tubuluswandverdickung führten. Heller et al. (1945) schließlich fanden eine Hyalinisierung der Tubuluswand bei Zuständen mit geringer Androgenproduktion.

Damit tritt - wie bei der Leydigzellhyperplasie - die Frage nach

dem kausalen Zusammenhang mit dem Spermatogenesedefekt oder einer beeinträchtigten Testosteronsynthese auf.

Auch hier läßt sich feststellen, daß für einige der erwähnten Zustände mit Spermatogenesedefekten - so für Bestrahlung (Ellis et al., 1969), Hypophysektomie (Hooker, 1970) und Hitze (Van Demark et al., 1970) - verminderte Androgenspiegel angegeben wurden.

### Leydigzellen:

Aus den Befunden der Zunahme des Leydigzellflächenanteils und der gleichbleibenden Zellgröße ergibt sich der Schluß auf das Vorliegen einer Leydigzellhyperplasie.

Faktoren, die zu einer Einschränkung dieser Aussage zwingen könnten, bleiben auf das Ergebnis ohne entscheidenden Einfluß.

Eine Verwechslungsmöglichkeit von Fibroblasten mit jungen Leydigzellen ist für die Meßwerte nicht relevant, weil die verwechselbaren Zellen in zu geringer Anzahl auftraten und der epitheliale Charakter der Leydigzellen zu ausgeprägt und allgemein vorhanden war (Abb. 9).

Repräsentativ für den ganzen Hoden sind die Werte, weil die Hoden in zufällig wechselnder Richtung geschnitten wurden, weil mit den ausgezählten 21 Gesichtsfeldern der größte Teil der Schnittfläche erfaßt wurde und weil keine Leydigzelladenome, sondern eine diffuse Hyperplasie vorlag.

Eine scheinbare, relative Flächenzunahme kann auf einer Reduzierung des Tubulusflächenanteils bei gleichbleibendem Leydigzellanteil beruhen. Sie liegt hier nicht vor, weil die statistische Prüfung der Tubulusdurchmesser keine Unterschiede zwischen den drei Reihen ergab und eine Schätzung der zu erwartenden relativen Flächenzunahme zeigte, daß am 18. Tag nur eine Steigerung auf bis zu

14,5 % und am 26. Tag auf 10,7 % durch eine Abnahme des Tubulusflächenanteils erklärt werden könnte - nicht aber die Steigerung auf 21,2 bzw. 14,5 %. (Methode dieser Schätzung: Der relative Flächenanteil der Tubuli verringert sich unter der Voraussetzung, daß alle Tubuli quergeschnitten sind, d.h. ihre Flächen als Kreisflächen aufzufassen sind, proportional zum Quadrat ihrer Durchmesser. Bei konstant angenommenem Leydigzell- und Bindegewebsanteil führt allein der verringerte Tubulusanteil zu einer kleineren Hodenschnittfläche, innerhalb derer Leydigzell- und Bindegewebsanteil also relativ ansteigen. Gegenübergestellt wurden die Tubulusflächenanteile auf der Basis ihrer Durchmesser im Tagesdurchschnitt der 10,0 TE-Reihe und im - höher als die fraglichen Tagesdurchschnitte liegenden - Gesamtdurchschnitte der Kontrollreihe.)

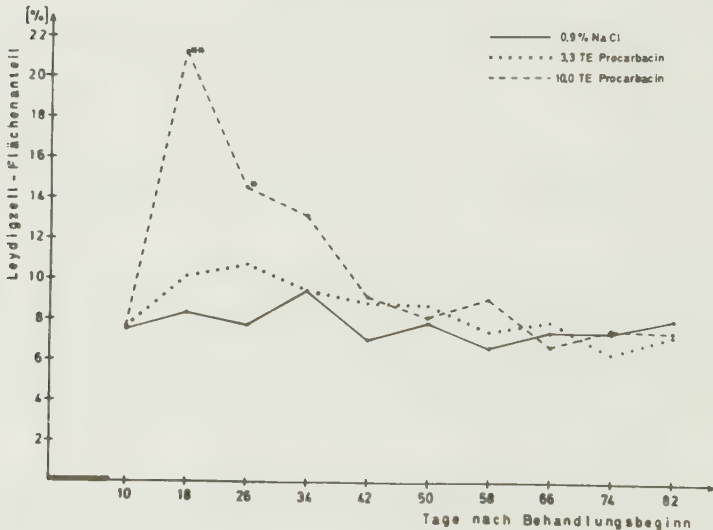


Fig. 6: Leydigzell-Flächenanteil  
(Unterschiede gegen Kontrollen signifikant: +,  
hochsignifikant: ++; Behandlungszeitraum auf  
Abszisse verstärkt)

Leydigzellhyperplasien sind bisher beim Klinefelter-Syndrom (Heinke, 1960, Steinberger, 1967, Hudson et al., 1970) und männlichen Hermaphroditismus (Jirásek, 1967, Grant, 1967), bei artefizielltem Kryptorchismus (Lynch et al., 1951, Clegg, 1961), bei Varicocele (Hundeiker, 1970), bei Rückenmarksläsionen (Horne et al., 1948), bei Cadmiumläsion (Gunn et al., 1970) und nach Ethionin-Medikation (Benson et al., 1966, Goldberg et al., 1959, 1968) beschrieben worden.

Procarbacin führte in unserem Versuch erst bei einer Dosis von  $5 \times 10,0$  TE zu einer Hyperplasie der Leydigzellen (Fig. 6), die 18 Tage nach Behandlungsbeginn plötzlich in vollem Ausmaß vorhanden war, während am 10. Tag der Flächenanteil noch geringfügig unter dem Durchschnitt der Kontrollen lag und keinerlei Hinweis auf eine proliferative Aktivität aufwies.

Zytologische Veränderungen, die zu dieser Hyperplasie hätten führen können, wurden nicht in ausreichendem Maße gefunden. Die selten zu beobachtenden Mitosen (Abb. 10) können allenfalls als ein prinzipieller Weg verstanden werden. Hooker (1970) stellt in seiner Übersichtsarbeit die Metamorphose aus Vorgängerzellen (mesenchymale oder fibroblastische Zellen) als Hauptweg heraus. Mietkiewski et al. (1968) dagegen berichten von amitotischen Teilungen während der Leydigzellregeneration bei Trenimonbehandlung. Als Ursachen der Hyperplasie bieten sich mehrere denkbare Möglichkeiten an:

Eine direkte differenzierungs- oder proliferationsfördernde Wirkung des Procarbacins auf Leydigzellen erscheint wegen der bekannten, allgemein proliferationshemmenden Wirkung und des um mindestens 10 Tage verzögerten Auftretens der Hyperplasie als äußerst unwahrscheinlich.

Ihr später Beginn legt vielmehr den Gedanken an einen indirekten,

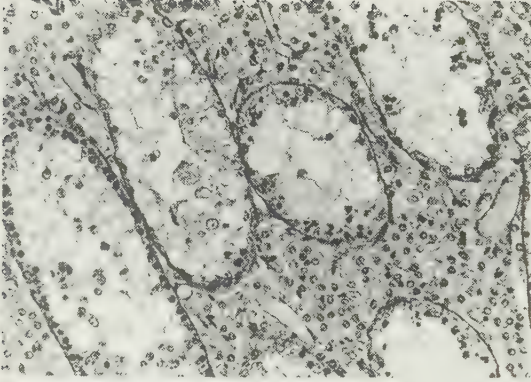


Abb. 9:  
Leydigzellhyper-  
plasie nach  
10,0 TE,  
18. Tag

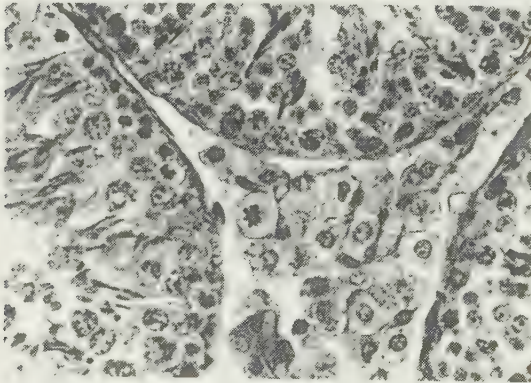


Abb. 10:  
Leydigzelle in  
Metaphase

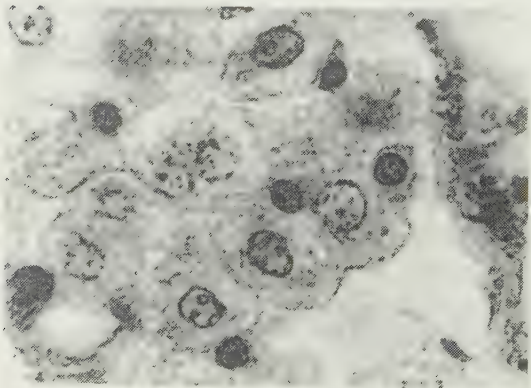


Abb. 11:  
degenerierende  
Leydigzellen  
(Eosinophilie,  
Kernpyknose),  
26. Tag

von irgendeiner primären Procarbacinwirkung ausgelöst und durch ein vermittelndes System gesteuerten Effekt nahe - und damit den Gedanken an die Gonadotropine.

Tatsächlich konnten verschiedene Autoren eine Wirksamkeit von Gonadotropinen nicht nur auf Androgenproduktion (Hooker, 1970, Ying et al., 1965, Nieschlag et al., 1970) und -Freisetzung (Eik-Nes, 1967), sondern auch auf die Zwischenzellhistologie nachweisen (Schoen et al., 1965, Christensen et al., 1969).

So beschrieben Lostroh (1963), Hooker (1970) und Christensen et al. (1969) nach Leydigzellinvolution durch Hypophysektomie eine Wiederherstellung normaler, hypertropher oder hyperplastischer Leydigzellen durch Gabe von ICSH. Steinberger et al. (1967) fanden nach HCG-Behandlung bei der Ratte große interstitielle Areale voller Leydigzellen und in Zellkulturen eine gesteigerte leydigzellspezifische Enzymaktivität. Jailer (1938) berichtete beim Meerschweinchen über einen Anstieg der Leydigzellen nach Zahl und Größe, der schon zwei Tage nach Behandlung mit einem Gonadotropinextrakt aus Schwangerenharn einsetzte, und Hooker (1970) formulierte: "... existieren genug Berichte von einem Anstieg der Leydigzellzahl nach Gonadotropinbehandlung, um Vertrauen zu geben, daß Gonadotropin wahrscheinlich eine Leydigzelldifferenzierung hervorruft ..."

Die beschriebenen Arbeiten belegen, daß die Gonadotropine - und unter ihnen besonders das ICSH - grundsätzlich in der Lage sind, die geforderte Mittlerfunktion zu übernehmen.

Die Frage nach der primären Procarbacinwirkung, die ihrerseits zu einer gesteigerten Gonadotropinfreisetzung führt, kann nicht sicher beantwortet werden. Als eine - hier quantitativ erfaßte - Möglichkeit bietet sich die Spermatogeneseschädigung an. Das setzt jedoch einen Faktor voraus, der - seinerseits spermatogeneseabhängig - die Reaktion der Hypophyse auslöst. Eine solche Substanz

konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Dennoch wurde aus verschiedenen Befunden auf ihre Existenz geschlossen. Gonozytin (Levina, 1970), Inhibin (Mc Cullagh et al., 1952, Johnsen, 1970) und X-Hormon (Howard et al., 1950) wurden genannt. Da das Gonozytin in der frühen Ontogenese wirksam sein und das X-Hormon dem Inhibin entsprechen soll, bleibt hier nur das letzte zu diskutieren.

Inhibin soll ein Östrogen sein, das einerseits die FSH-Freisetzung hemmt und andererseits die ICSH-Produktion stimuliert (Heinke, 1960, Johnsen, 1970). Seine Produktion soll in Sertolizellen in Abhängigkeit von der Existenz elongierter Spt erfolgen - sind diese vermindert, sinkt auch die Inhibin-Freisetzung und die FSH-Sekretion steigt (Johnsen, 1970).

Als Modell ist die Inhibin-Hypothese hier zu verwenden, wenn dabei unterstellt wird, daß statt der ICSH-Stimulierung eine Hemmung durch die Substanz erfolgt.

Die Leydigzellhyperplasie - bei Jailer (1938) schon 48 Stunden nach der ersten Gonadotropingabe zu beobachten - trat an dem Tag auf, an dem die Spermatogeneseschädigung erstmals, noch in geringem Ausmaß, die elongierten Spt erreichte. Die Verminderung dieser Zellen bleibt jedoch länger bestehen als die Leydigzellhyperplasie, so daß eher eine zeitliche Korrelation zu der Verminderung der runden Spt zu bestehen scheint.

Als andere Stützen des Inhibin-Modells können die oben angeführten Fälle von gleichzeitig vorliegender Leydigzellhyperplasie und Spermatogeneseschädigung sowie die Beobachtungen gesteigerten ICSH-Freisetzung nach Orchidektomie (Steinberger et al., 1966, Gay et al., 1969, Lawton, 1970, Yamamoto et al., 1970), bei Kryptorchismus (Steinberger et al., 1966, Hooker, 1970) und beim Klinefelter-Syndrom (Hudson et al., 1970, Franchimont, 1970) aufgefaßt werden.

Daß dennoch die Leydigzellstimulation nicht unbedingt auf den Spermatogenesedefekt zurückzuführen ist, belegt die Tatsache, daß für die meisten dieser Zustände auch eine verminderte Testosteronserumkonzentration bzw. -synthese beschrieben worden ist - so beim Klinefelter-Syndrom (Hudson et al., 1970, Lipsett et al., 1965), Kryptorchismus (Gomes, 1970, Hudson et al., 1970, Albert, 1961, Inano et al., 1968, Tamaoki et al., 1969), männlichen Hermaphroditismus (Tamm, 1970b), Orchidektomie (Hudson et al., 1970) und Ethionin-Behandlung (Goldberg et al., 1968). In den Fällen von Varicocele (Hundeiker, 1970), Cadmium-Schädigung (Hundeiker, 1970, Waites et al., 1969) und Rückenmarksläsionen (Horne et al., 1948) läßt sich durch beeinträchtigte Durchblutungs- (Eik-Nes, 1964) oder Temperaturverhältnisse (Van Demark et al., 1970) eine verminderte Testosteronproduktion vermuten.

Im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus decken sich die ICSH-Steigerungen nach Orchidektomie, beim Klinefelter-Syndrom und beim Kryptorchismus auch mit diesem Konzept.

Diese Zusammenhänge sowie die Angaben über die Hemmwirkung von exogenem Testosteron auf die ICSH-Produktion (Heller et al., 1970) und die ICSH-Sekretionssteigerung nach Antiandrogenzufuhr (Neumann et al., 1970, Petry et al., 1970) lassen einen negativen Rückkopplungsmechanismus (Neumann et al., 1967, 1970) als verantwortlich für die Leydigzellhyperplasie nach Procarbacin erscheinen.

In Anbetracht der hohen Stoffwechselwirksamkeit dieses Methylhydrazins (Weitzel et al., 1967a, b, 1968, Berneis et al., 1963) liegt der Verdacht auf eine Beeinträchtigung der Testosteronproduktion, die ihrerseits eine ICSH-Stimulation bewirkt, nahe. (Nach TEM-Behandlung konnten Steinberger et al. 1959 und Gunn et al. 1963 Gewichtsabnahmen der akzessorischen Drüsen bei der Ratte feststellen.)

Die Verzögerung der Leydigzelldifferenzierung oder -proliferation bis zum 18. Tag könnte dann durch eine Dosisabhängigkeit, die zu einer Kumulation der Wirkung auf die Androgensynthese von der ersten bis zur fünften Injektion führte, und/oder durch eine differenzierungs- und proliferationshemmende Wirkung des Procarbamins während des Behandlungszeitraumes erklärt werden.

In Anwendung dieses Modells ist die Rückkehr des Leydigzellapparats vom hyperplastischen Zustand zur Norm entweder auf die Regeneration des Tubulusepithels und die damit wieder einsetzende Inhibinproduktion oder - wahrscheinlicher - auf einen Wiederanstieg der Testosteronsynthese (in beiden Fällen über eine ICSH-Hemmung) zurückzuführen.

Entsprechende regressive Veränderungen haben Lynch et al. (1951) und Limanowski (1970) nach exogener Testosteronzufuhr und Simpson et al. (1944) nach HCG- und ICSH-Gabe beschrieben.

Die Leydigzellen entdifferenzieren sich in unserem Versuch offensichtlich nicht zu fibroblastenähnlichen Zellen - wie das bei Limanowski (1970) und Hooker (1970) vermutet wurde -, sondern degenerieren, wie es die in der Phase der Abnahme der Hyperplasie zahlreich auftretenden Leydigzellen mit Veränderungen in Form von reduzierter Zellgröße, Eosinophilie des Zytoplasmas, Kernpyknose und Auflösung der Kernstruktur belegen (Abb. 11).

Diese Befunde stimmen, soweit das an Hand der Texte zu beurteilen ist, mit denen von Simpson et al. (1944), Lynch et al. (1951) und Mietkiewski et al. (1968), die bei Trenimonbehandlung gleichzeitig degenerative und regenerative Veränderungen der Leydigzellen beobachteten, überein.

### Vaskularisation:

In beiden procarbacinbehandelten Reihen trat eine deutliche, gleichstarke Hypervaskularisation auf (Fig. 7). Sie wurde in der 3,3 TE-Reihe vom 26. bis 50. bzw. 58. Tag (je nach Vergrößerung) und in der 10,0 TE-Reihe vom 18. bis 42. Tag festgestellt.

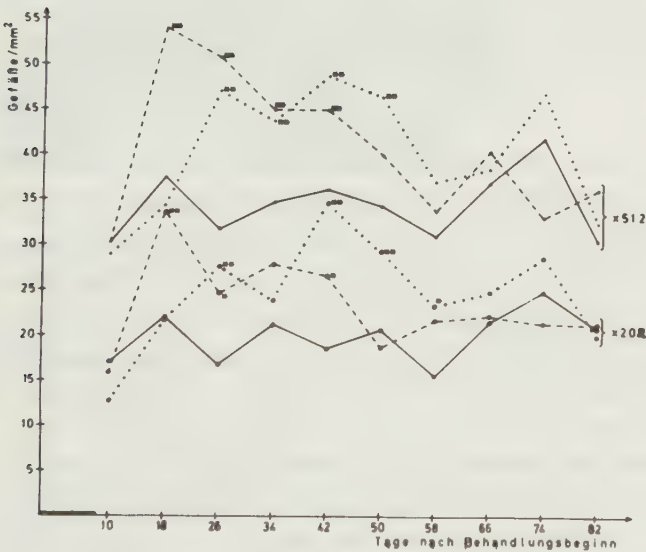


Fig. 7: Anzahl der Blutgefäße je  $\text{mm}^2$  Hodenparenchym bei 202-facher und 512-facher Vergrößerung (— Kontrolle, ..... 3,3 TE, ---- 10,0 TE; Unterschiede gegen Kontrollen signifikant: +, hochsignifikant: ++; Behandlungszeitraum auf Abszisse verstärkt)

Diese Steigerung der Gefäßanzahl in den behandelten Reihen um ca. 40 % gegenüber der Kontrollreihe geht aus den Befunden bei beiden Vergrößerungen gleichwertig hervor, wie die Varianzanalyse nachwies. Dagegen ist die Bestimmung des absoluten Ausmaßes der Vaskularisation erst bei der stärkeren Vergrößerung möglich, da bei der schwächeren regelmäßig zahlreiche kleine

Blutgefäße nicht erkannt werden.

Weil bei der Zählung nicht zwischen den einzelnen Blutgefäßarten unterschieden wurde, stellen naturgemäß die Arteriolen, Zwickelkapillaren, Querkapillaren und postkapillären Venolen (vgl. Hundeiker, 1970) den weit überwiegenden Teil der angegebenen Gefäße. Und da man bei diesen davon ausgehen darf, daß sie in einem zufällig gelegten Hodenschnitt gleichmäßig verteilt sind, wurde mit den 8 Gesichtsfeldern bei 202-facher und den 16 Gesichtsfeldern bei 512-facher Vergrößerung eine repräsentative Blutgefäßanzahl ermittelt.

Als eine in ihrer Auswirkung auf das Ergebnis als gering zu veranschlagende Fehlerquelle kann die Existenz von Lymphgefäßen im Hoden angesehen werden. Es ist denkbar, daß gelegentlich ein Lymphgefäß mitgezählt worden ist, wenn es wie die Blutgefäße einen gleichmäßig runden Querschnitt aufwies. Da aber die Lymphkapillaren um die Tubuli contorti und die kleinen Sammelgefäße in den Intertubularzwickeln sehr dünnwandig und in aller Regel in ihrem Querschnitt ungleichmäßig, oft spaltförmig imponieren und außerdem bei der Ratte die Bindegewebstrabekel ("Septula") mit den stärkeren Lymphgefäßstämmen schwach entwickelt sind (vgl. Hundeiker, 1970, Setchell, 1970), dürfte eine Verwechslung von Lymph- und Blutgefäßen nur sehr selten vorgekommen sein. (Die genannten morphologischen Kriterien beruhen auf Untersuchungen beim Stier, bei der Ratte und beim Menschen.)

Wenn also bei 202-facher Vergrößerung verlässlich eine erhöhte Anzahl von Blutgefäßen in den behandelten Reihen gefunden wird, so kann das auf einer Vasodilatation beruhen - ein solcher Effekt liegt hier sicher vor (Abb. 12).

Nehmen wir nun an, daß diese Dilatation die einzige Gefäßreaktion darstellt, dann bedeutet das, daß in den behandelten Tieren die kleinen, in den Kontrollen noch nicht erkannten Gefäße jetzt sichtbar

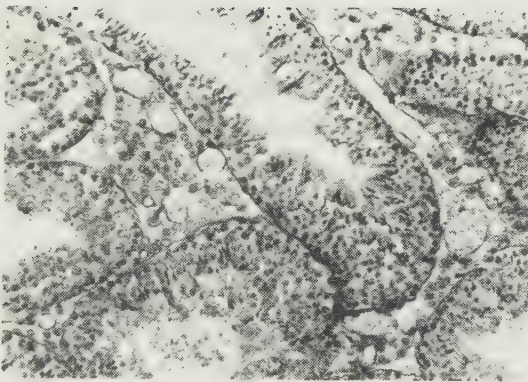


Abb. 12:  
Hypervaskulari-  
sation  
42. Tag nach  
10,0 TE

geworden sind und daß demnach beim Wechsel zu 512-facher Vergrößerung zusätzlich nicht mehr so viele kleine Gefäße sichtbar werden konnten wie in den unbehandelten Tieren, denn schließlich ist der bei geringerer Vergrößerung nicht erkennbare Pool der kleinen Gefäße durch die Dilatation bei den behandelten Tieren kleiner geworden.

Der Faktor F (Gefäße bei Vergr.  $\times 512$  / Gefäße bei Vergr.  $\times 202$ ) müßte folglich in der 3,3- und in der 10,0 TE-Reihe deutlich kleiner sein als in der Kontrollreihe und sich dem Wert 1 annähern. Dabei ist vorauszusetzen, daß bei 512-facher Vergrößerung alle offenen Blutgefäße sichtbar sind. Für Objekte in der Größenordnung von 5  $\mu$  trifft diese Voraussetzung sicher zu.

Tatsächlich aber ist F mit 1,74 bei den Kontrollen, 1,64 nach 3,3 TE und 1,75 nach 10,0 TE Procarbacin praktisch konstant geblieben. Daraus folgt, daß in den behandelten Reihen auch absolut mehr offene Blutgefäße vorliegen und demnach entweder bisher verschlossene Gefäße aufgegangen oder neue Gefäße eingesproßt sind.

Als Ursachen dieser Hypervaskularisation sind verschiedene Mög-

lichkeiten in Betracht zu ziehen.

Eine zentrale, nervale Steuerung erscheint unwahrscheinlich, weil sie wegen der rein sympathischen Innervation der Hodengefäße (Hooker, 1970, Waites et al., 1969) über einen verminderten Sympathicotonus erfolgen müßte. Es liegt keinerlei Hinweis für einen solchen Mechanismus vor.

Daneben könnte die Regulation lokal durch verschiedene Metabolite erfolgen, wie das z.B. bei Muskelarbeit bekannt ist (Bollinger, 1970, Wetterer, 1967). Wie weit im Hoden und in diesem Fall die Voraussetzungen dieser Steuerung gegeben sind, kann hier nicht beurteilt werden.

Interessant sind jedoch die Befunde von Kuppermann et al. (1948) und Wurtman (1964), die durch LH eine Hyperämie der Ovarien erzeugen konnten, während FSH allein praktisch unwirksam blieb. Hartmann et al. (1950) wiesen schließlich eine durch HCG erzeugte Vasodilatation im Rattenhoden nach, und Setchell et al. (1968) reduzierten die Testisdurchblutung durch Hypophysektomie.

Demnach erscheint es möglich, die Hypervaskularisation entsprechend der Leydigzellhyperplasie auf eine gesteigerte ICSH-Freisetzung zurückzuführen.

Diese These wird auch dadurch gestützt, daß die Gefäßreaktion zum selben Zeitpunkt auftritt wie die Leydigzellhyperplasie.

Dabei muß die acht Tage später einsetzende und entsprechend länger anhaltende Hypervaskularisation nicht unbedingt ein Widerspruch sein. Denn einerseits lagen auch hier die höchsten - aber nicht signifikant unterschiedlichen - Leydigzellflächenanteile vom 18. bis 34. Tag vor, und andererseits ist es denkbar, daß die Gefäßreaktion schon bei geringeren Gonadotropinspiegeln auftritt als die Leydigzelldifferenzierung oder -proliferation.

Einen ähnlich verzögerten, am 35. Tag auftretenden Anstieg der

Blutgefäßzahl beschrieben auch Kochar et al. (1971) nach 1000 r  
Testisbestrahlung bei der Maus.

## CYTOPHOTOMETRIE I

### Besprechung der Ergebnisse der Fastgreen-Färbung

Mit der Fastgreen-Färbung wurden 11480 Spermatozoen, 5796 Hoden- und 5684 Nebenhodenspermatozoen von insgesamt 59 Tieren untersucht. Ein Tier der mit 10 TE Procarbacin behandelten Reihe zeigte weder im Hoden- noch im Nebenhodenausstrich Spermatozoen.

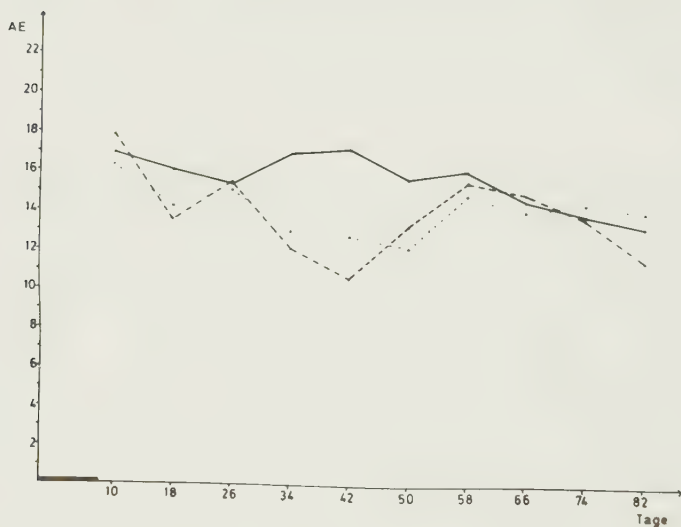


Fig. 8: Vergleichende Darstellung der Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen.  
—— Kontrolle, ..... 3,3 TE, ---- 10 TE

## 1. Hodenspermatozoen

- 1.1. Die Fig. 8 zeigt, daß die Kurven der behandelten Reihen zu gewissen Zeitpunkten deutlich abgesetzt von der Kontrollkurve verlaufen.

Bereits am 18. Meßtag findet sich eine signifikant geringere Fastgreen-Anfärbbarkeit der 10 TE-Reihe gegenüber der Kontrolle. Während ab 26. Tag die 3,3 TE-Kurve weniger stark abfällt, - die Meßwerte sind erst ab 42. Tag gegenüber dem 26. Meßtag signifikant abgefallen - ist der Abfall der 10 TE-Kurve abrupt und schon zum 34. Tag mit  $P < 1 \%$  signifikant. An den aufeinanderfolgenden Meßtagen, 34., 42. und 50. Tag, sind die Spermatozoen der behandelten Tiere signifikant weniger stark anfärbbar als die der Kontrollreihe. Am 42. Tag, dem Minimum der 10 TE-Kurve, beträgt die Differenz zur Kontrollkurve 6,59 AE (ca. 40 %!). Ab 58. Tag bis zum Beobachtungsende finden sich die Meßwerte der behandelten Reihen wieder im Bereich derjenigen der Kontrollreihe.

- 1.2. Beim Vergleich der Meßwerte einer Reihe zeigte sich bei der Kontrollreihe, nachdem der Verlauf bis zum 66. Tag unauffällig war, an den beiden letzten Meßtagen ein signifikanter Abfall der Anfärbbarkeit gegenüber den Werten vorangegangener Stichtage.

Ähnlich verhält sich die 10 TE-Kurve, die nach ihrem Wiederanstieg einen signifikanten Abfall der Meßwerte ab 66. Tag gegenüber denen vom 10. und 26. Tag aufzeigt.

Keinen Abfall zeigt die 3,3 TE-Kurve während der letzten Meßtage.

## 2. Nebenhodenspermatozoen

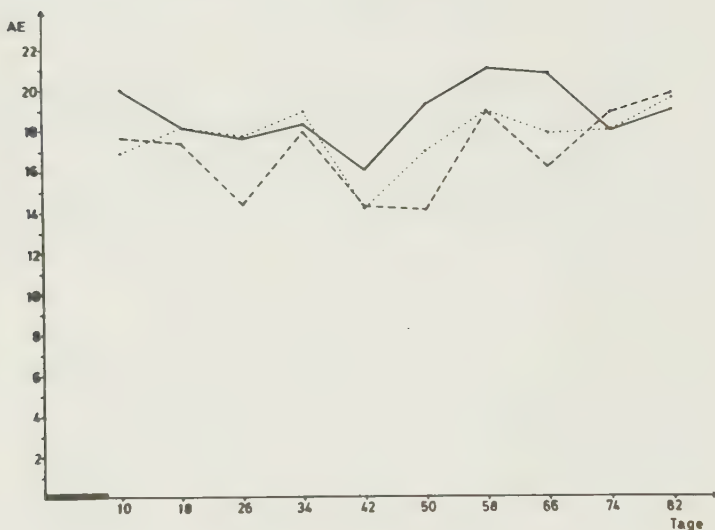


Fig. 9: Vergleichende Darstellung der Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen.  
 — Kontrolle, ..... 3,3 TE, ----- 10 TE

- 2.1. Die Kurven aller drei Versuchsreihen verlaufen statistisch gesehen parallel. Deutliche Unterschiede zwischen den Reihen bestehen nicht. Eine verminderte Anfärbbarkeit gegenüber der Kontrollreihe tritt nur in der hochdosierten 10 TE-Reihe am 50. und 66. Tag auf. Der Tiefpunkt der 10 TE-Kurve des Hodens tritt in der 10 TE-Kurve des Nebenhodens 8 Tage später, am 50. Tag, auf.
- 2.2. Ein den Hodenspermatozoen analoger Abfall der Anfärbbarkeit gegen Ende der Beobachtungszeit tritt nicht auf.

### 3. Vergleich der Fastgreen-Anfärbarkeit der Hoden- und Nebenhodenspermatozoen

Beim Vergleich der Fastgreen-Anfärbarkeit der Spermatozoen von Hoden und Nebenhoden findet sich eine deutliche Häufung der Fälle mit signifikant stärkerer Fastgreen-Anfärbarkeit der Nebenhodenspermatozoen.

In der Kontrollreihe stellen sich an 7 von 10 Meßtagen die Nebenhodenspermatozoen als signifikant stärker anfärbbar dar als die Hodenspermatozoen. An den übrigen 3 Tagen liegt kein signifikanter Unterschied vor.

In der 3,3 TE-Reihe findet sich an 8 von 10 Tagen, in der 10 TE-Reihe an 6 von 10 Tagen eine signifikant höhere Fastgreen-Anfärbarkeit der Nebenhodenspermatozoen gegenüber den Hodenspermatozoen. Die signifikanten Unterschiede zwischen Hoden- und Nebenhodenspermatozoen bewegen sich in den 3 Reihen im Bereich von 2,22 bis 8,22 AE!

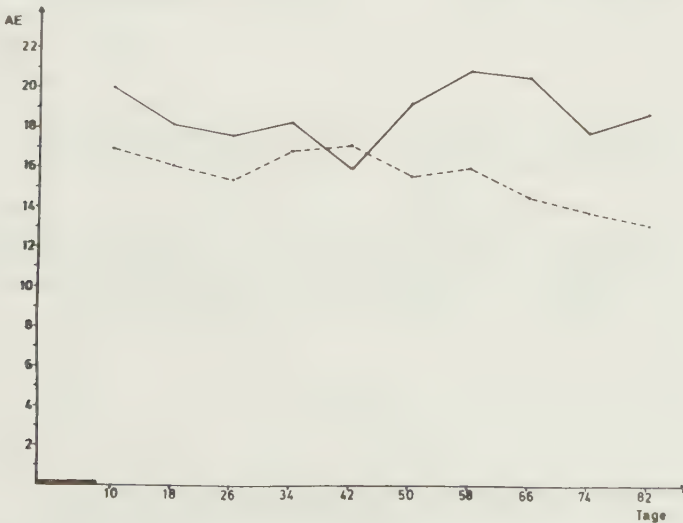


Fig. 10: Vergleichende Darstellung der nach Fastgreen-Färbung an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen der Kontrolltiere gefundenen Meßwerte. --- Hoden, — Nebenhoden

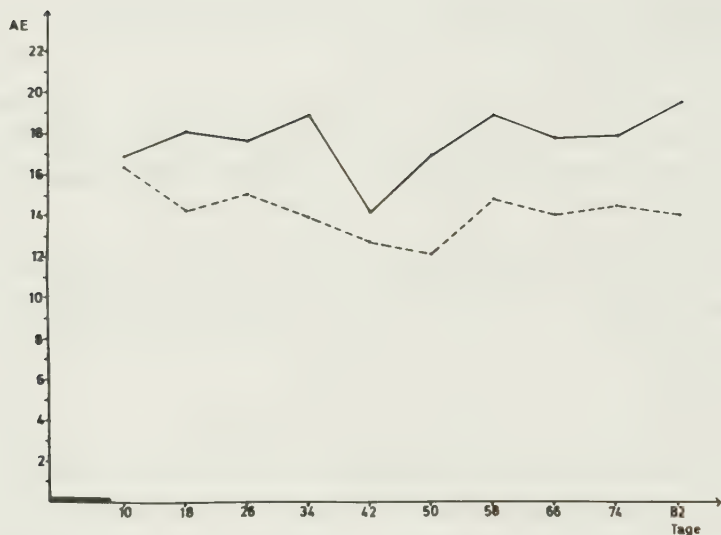


Fig. 11: Vergleichende Darstellung der nach Fastgreen-Färbung an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen der 3,3 TE-Tiere gefundenen Meßwerte. --- Hoden, — Nebenhoden

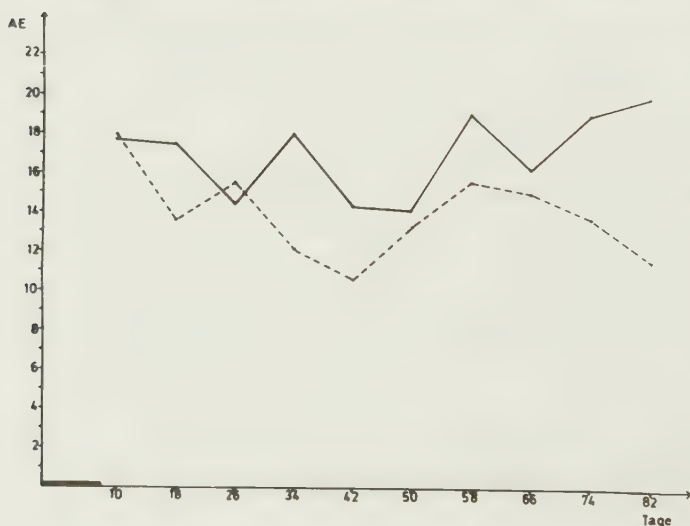


Fig. 12: Vergleichende Darstellung der nach Fastgreen-Färbung an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen der 10 TE-Tiere gefundenen Meßwerte. --- Hoden, — Nebenhoden

## Besprechung der Ergebnisse der Sakaguchi-Färbung

Mit der Sakaguchi-Färbung wurden 10856 Spermatozoen, 5690 Hoden- und 5166 Nebenhodenspermatozoen von insgesamt 59 Tieren untersucht. Ein Tier der mit 10 TE Procarbacin behandelten Reihe (entspricht dem Tier bei der Fastgreen-Färbung) zeigte weder im Hoden- noch im Nebenhodenausstrich Spermatozoen.

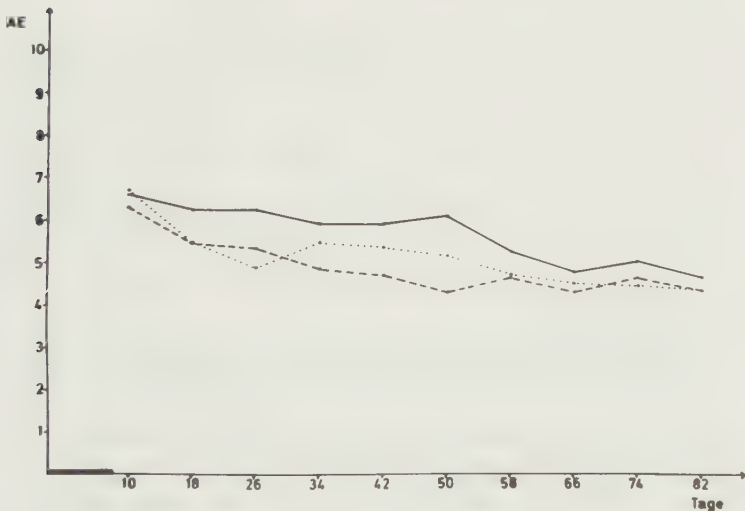


Fig. 13: Vergleichende Darstellung der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen.  
—— Kontrolle, ..... 3,3 TE, ---- 10 TE

## 1. Hodenspermatozoen

- 1.1. Die Fig. 13 zeigt die Kurven der 3 Versuchsreihen, die einen parallelen Verlauf aufweisen. Die Kurven der mit Procarbacin behandelten Reihen liegen deutlich unter der Kontrollkurve. Bei den mit 10 TE Procarbacin behandelten Mäuseböcken findet sich eine signifikant verminderte Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen gegenüber der Kontrollreihe ab 18. Tag und ist über insgesamt 5 Untersuchungstermine bis hin zum 50. Tag nachweisbar.

Dagegen läßt sich bei der mit 3,3 TE schwächer dosierten Reihe nur zweimal ein signifikanter Unterschied zur Kontrollreihe nachweisen, am 26. und 50. Tag. Am letzteren stellen sich die Spermatozoen der 10 TE-Reihe nicht nur signifikant weniger anfärbbar gegenüber denjenigen der Kontrollreihe dar, sondern auch gegen die der 3,3 TE-Reihe. Ab 58. Tag inklus. liegen die Meßwerte der behandelten Reihen wieder im Bereich der Kontrollreihe.

Beachtenswert ist, daß alle signifikanten Unterschiede zwischen den Reihen ausschließlich in den zusammenhängenden Zeitraum der 5 genannten Untersuchungstermine fallen.

- 1.2. Beim Vergleich der Meßwerte einer Reihe zeigt sich ab 58. Tag bei der Kontrollkurve, deren Werte bis zum 50. Tag unauffällig waren, ein signifikanter Abfall der Anfärbbarkeit gegenüber den Meßwerten vorangegangener Untersuchungstage.

## 2. Nebenhodenspermatozoen

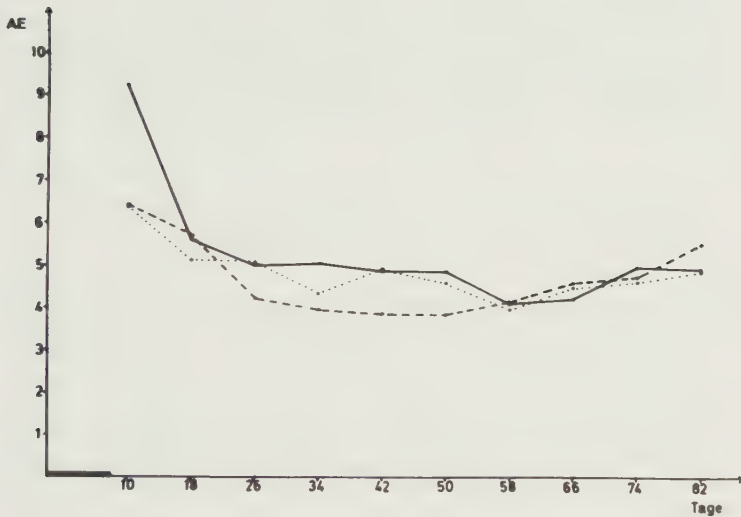


Fig. 14: Vergleichende Darstellung der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen.  
— Kontrolle, .... 3,3 TE, ---- 10 TE

2.1. Analog den Ergebnissen der sakaguchigefärbten Hodenspermatozoen findet sich bei den Nebenhodenspermatozoen ebenfalls eine zeitlich begrenzt signifikant geringere Anfärbbarkeit der Spermatozoen der mit Procarbazin behandelten Mäuse.

Die Nebenhodenspermatozoen sind in der 10 TE-Reihe in einem 4 Beobachtungstermine umfassenden, zusammenhängenden Zeitraum - vom 26. Tag bis inkl. 50. Tag - signifikant weniger anfärbbar als in der Kontrollreihe. Zusätzlich läßt sich in der 10 TE-Reihe bereits am 10. Tag eine signifikant geringere Anfärbbarkeit nachweisen.

Dagegen stellen sich die Spermatozoen der mit der schwächeren Dosis behandelten Tiere nur am 10. und 34. Tag als sig-

nifikant weniger anfärbbar dar.

Signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Reihen selbst sind dreimal nachweisbar. Die 10 TE-Reihe weist am 26., 42. und 50. Tag signifikant geringere Anfärbbarkeit der Spermatozoen gegenüber den Spermatozoen der 3,3 TE-Reihe auf.

Wie bei den Hodenspermatozoen (Sakaguchi- sowie Fastgreen-Färbung) laufen auch hier ab 58. Tag inkl. die Kurven der behandelten Tiere im Bereich der Kontrollkurve.

- 2.2. Beim Vergleich der Meßwerte innerhalb einer Reihe fällt auf, daß bei allen 3 Reihen die Meßwerte des 10. Beobachtungstages signifikant höher liegen als sämtliche Meßwerte vom 26. bis 82. Tag. Nur bis zum 50. Tag kann dies bei den behandelten Tieren auf das Procarbazin zurückgeführt werden.

### 3. Vergleich der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hoden- und Nebenhodenspermatozoen

Beim Vergleich der Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hoden und Nebenhodenspermatozoen in den Kontrollreihen stellen sich die Nebenhodenspermatozoen an 6 von 10 Meßtagen als signifikant geringer anfärbbar dar als die Hodenspermatozoen. Diese geringere Anfärbbarkeit tritt in einem geschlossenen Zeitraum vom 18. bis 58. Tag inkl. auf. An den 3 letzten Meßtagen ist kein Unterschied feststellbar. Allein am 10. Meßtag liegt mit der signifikant stärkeren Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen ein umgekehrtes Verhältnis vor.

In den behandelten Reihen dagegen ist ein signifikanter Unterschied zwischen Hoden- und Nebenhodenspermatozoen seltener. Er ist jeweils nur in 3 Fällen nachweisbar, bei der 3,3 TE-Reihe am 34., 50. und 58. Tag, bei der 10 TE-Reihe am 26., 34. und 42. Tag. In allen diesen Fällen finden sich die Hodenspermatozoen geringer

angefärbt als die Nebenhodenspermatozoen.

Die Häufung der Fälle mit stärkerer Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen ist deutlich und steht genau in umgekehrtem Verhältnis zu den Befunden bei der Fastgreen-Färbung, wo eine stärkere Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen gefunden wurde.

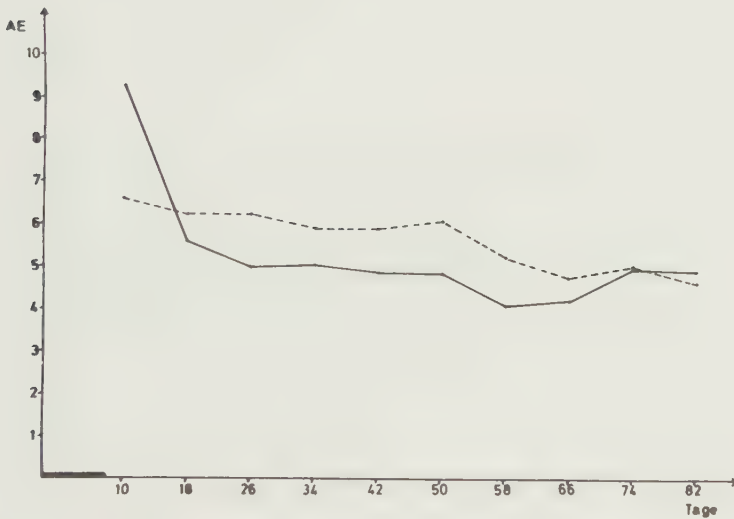


Fig. 15: Vergleichende Darstellung der nach Sakaguchi-Färbung an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen der Kontrolltiere gefundenen Meßwerte. ---- Hoden, — Nebenhoden

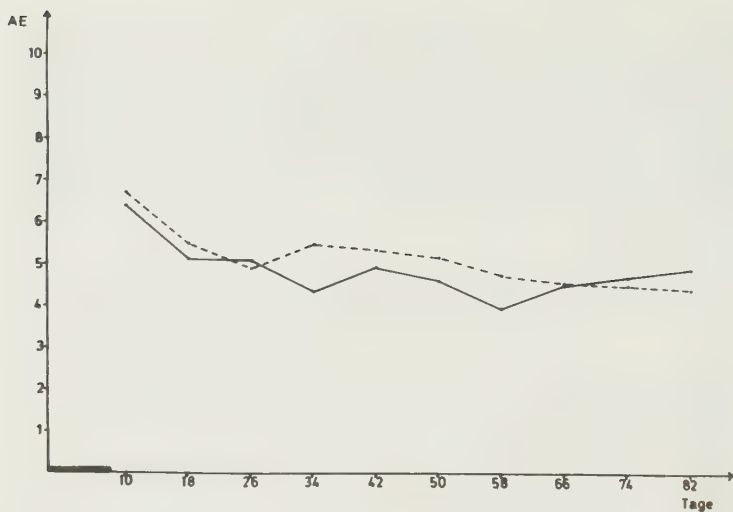


Fig. 16: Vergleichende Darstellung der nach Sakaguchi-Färbung an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen der 3,3 TE-Tiere gefundenen Meßwerte. ---- Hoden, — Nebenhoden

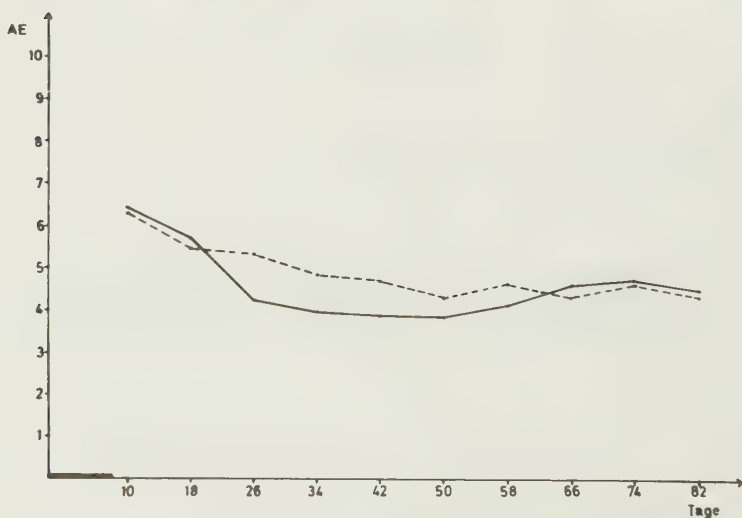


Fig. 17: Vergleichende Darstellung der nach Sakaguchi-Färbung an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen der 10 TE-Tiere gefundenen Meßwerte. ---- Hoden, — Nebenhoden

## Diskussion der Fastgreen- und Sakaguchi-Färbung

Histochemische Veränderungen während der Spermiogenese sind in den letzten Jahren gehäuft Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

Diese histochemischen und autoradiographischen Untersuchungen (Alfert 1956, Bloch und Hew 1960, Das et al. 1964, Bloch und Brack 1964, Gledhill et al. 1966) ergaben, daß während der Reifungsphase der gestreckten Spermatiden (elongated sperms) der typische somatische Histontyp, reich an Lysin im Vergleich zu Arginin, ersetzt wird durch einen Histontyp, der einen größeren Arginingehalt besitzt.

In einer mikrospektrophotometrischen Untersuchung an Ratten stellt Vaughn (1966) fest, daß während der Phase der gestreckten Spermatiden ein Lysinverlust von 70 % auftritt.

Bei einigen Spezies wird dieses argininreiche Histon wiederum ersetzt durch Protamin, einem kleinmolekularen Eiweiß, das bis zu 75 % aus Arginin besteht. Histochemisches Äquivalent für diesen Histonwechsel ist nach Alfert (1956, 1957) das Bestehenbleiben der alkalischen Fastgreen-Färbbarkeit nach Acetylierung, was im Gegensatz zum lysinreichen Histon eine Eigenschaft des argininreichen ist.

Mit autoradiographischen Techniken wies Monesi (1964, 1965) bei der Maus nach, daß der Einbau von  $H^3$ -markiertem Arginin im gleichen Zellstadium stattfindet wie der Histonwechsel. Im Gegensatz zum Arginin war der Einbau anderer markierter Aminosäuren einschließlich Lysin gering. Ein weiterer Wechsel des Histons zum Protamin findet bei der Maus nicht statt (Monesi 1967).

In der gleichen Arbeit (1965) zeigt der Autor mit Hilfe  $H^3$ -markierten Uridins, daß die RNS-Synthese bald nach der 2. Reifeteilung in der frühen Spermiogenese aufhört. Die gesamte RNS, die sich

in den mittleren und späten Spermatiden (ab Stufe 9) im Zytoplasma darstellt, ist mindestens eine Woche vorher während der meiotischen Prophase (Gipfel im Pachytän) gebildet worden.

Daraus schließt Monesi, daß die Proteinsynthese im Zytoplasma ab Stufe 9 (späte und mittlere Spermatiden) bei gleichzeitig fehlender neuer RNS-Synthese in der Zelle, von einer langlebenden RNS aufrechterhalten wird, die, während der Meiose gebildet, im Laufe der Spermiogenese wirksam wird (Monesi 1965, 1967).

Andere Autoren (Grasso et al. 1963, Marks et al. 1962) postulieren ebenfalls die Existenz einer langlebenden RNS. Bei ihren autoradiographischen Versuchen an Blutzellen stellen sie fest, daß die Proteinsynthese in späten Zellstadien nicht von RNS-Synthese begleitet ist, diese dagegen in früheren Zellstadien vollzogen wird.

Diese Vermutung wird bekräftigt durch Versuche von Monesi und Salfi (1967) mit Actinomycin D. Die Autoren weisen nach, daß Actinomycin D in einer Dosis, die die RNS-Synthese in den Spermatozyten vollständig unterdrückt, die Proteinsynthese in den Spermatiden nicht verhindert.

Da die  $H^3$ -markierte Argininaufnahme auf die Spermatidstufen 11 - 14 (Monesi 1965) begrenzt ist und da erst ab Stufe 11 kein Verlust der Anfärbbarkeit nach Acetylierung auftritt, wäre damit, unabhängig von dem noch umstrittenen Syntheseort, die Synthese des argininreichen Histons ebenfalls von einer langlebenden RNS abhängig.

Das in unserer Untersuchung verwendete Procarbazin hat als Cytostaticum eine tiefgreifende und durch seine Abbauprodukte weit gestreute Wirkung auf die Proteinsynthese.

Der durch unsere cytophotometrischen Messungen festgestellte Abfall der Fastgreen-Anfärbbarkeit der Hoden- und Nebenhodenspermatozoen nach Procarbazinbehandlung kann auf die spezifische Wirkung des Procarbazins zurückgeführt werden.

Die zu den gleichen Zeitpunkten und bei denselben Tieren gefundene Abnahme der Sakaguchi-Anfärbbarkeit von Hoden- und Nebenhodenspermatozoen legt die Vermutung nahe, daß diese Zellen den Histonwechsel während der Spermatidentwicklung nicht haben vollziehen können. Die geringere Anfärbbarkeit in den beiden Färbungen wäre damit auf quantitative Unterschiede in Histon- und Arginingehalt zurückzuführen.

Zur Erklärung quantitativer Unterschiede bieten sich Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Procarbazin von Weitzel et al. (1967a, 1967b, 1968) an. Die Autoren weisen einen verminderten Proteineinbau  $C^{14}$  - markierten Leucins unter Procarbazinbehandlung nach (1967b). Für diesen verminderten Einbau wird das Abbauprodukt N-Isopropyl-4-formyl-benzamid verantwortlich gemacht, das als Aldehyd spontan mit Aminosäuren Schiff'sche Basen bildet. Von der gleichen Arbeitsgruppe wird für Lysin, Glycin und Cystin ebenfalls die Bildung Schiff'scher Basen nachgewiesen, die als solche oder in Form ihrer Salze kristallin gewonnen werden konnten. Analog zu dieser Arbeit beschreiben Fölsch et al. (1964), daß Procarbazin in vitro den Einbau markierten Glycins in das Protein von Asciteszellen hemmt. Es ist anzunehmen, daß auch Arginin mit dem aromatischen Aldehyd N-Isopropyl-4-formyl-benzamid unter Bildung Schiff'scher Basen reagiert, wodurch das Arginin der Proteinsynthese entzogen würde. Der hierdurch verminderte Einstrom des Arginins würde nicht nur zu vermindertem Arginingehalt führen, sondern auch, wie von uns festgestellt, zu einem gleichzeitig verminderten argininreichen Histongehalt. Dieser Mechanismus scheint uns durch den von Monesi (1965) gefundenen erhöhten Bedarf des elongierten Spermatids an Arginin diskussionswert zu sein.

Die Fähigkeit der Procarbazinabbauprodukte wie des  $H_2O_2$ , des Formaldehyds und des Formaldehydazins die RNS-Polymerase zu hemmen (Weitzel et al. 1968), könnte über eine verminderte Pro-

teinsynthese zu einem verminderten Histongehalt des Einzelspermatozoen führen.

Andere Abbauprodukte setzen in Asciteszellen (Weitzel et al. 1967 a) die Einbauraten von  $C^{14}$ -markiertem Uridin herab. Dies und die Hemmung der Bildung von Nucleosidtriphosphaten und des Eintritts von Nucleosiden (Weitzel et al. 1967 b - der Nucleosidbedarf für die RNS-Synthese ist erheblich höher als für die DNS-Synthese) und Purinbasen in die Zelle, könnten über eine verminderte RNS-Synthese zu einer verminderten Proteinsynthese führen, was sich im Spermium in einer verminderten Histonbildung äußern könnte.

Entsprechend den Versuchen von Monesi und Salfi (1967) mit Actinomycin D, kann unser Befund mit dem Abfall der Fastgreen-Anfärbbarkeit, der sich bei 10 TE Procarbazin erst mit dem 18. Tag darstellt, gedeutet werden. Die Zellen des Pachytäns und die während dieser Zeit gebildete RNS (Monesi 1965, 1967) kommen nach Oakberg (1956 b) frühestens nach ca. 14 Tagen in das Zellstadium, in dem der Histonwechsel stattfindet. Eine Störung der RNS-Synthese könnte dadurch erst zu späterer Zeit, wie von uns gefunden, in einer verminderten Fastgreen-Anfärbbarkeit ihr Äquivalent finden.

Hiermit wäre auch die zeitliche Begrenzung der verminderten Fastgreen- und Sakaguchi-Anfärbbarkeit erklärbar.

Ein signifikanter Abfall des Arginingehalts (verminderte Sakaguchi-Anfärbbarkeit) eines Patienten nach Methotrexatbehandlung wird von Meyhöfer (1967) berichtet. Zusätzlich beschreibt der Autor einen Abfall der Spermatozoenzahl von 610.312.500 pro ml auf 10.312.500 pro ml nach 150 mg Methotrexat.

Obwohl es naheliegt, die teilweise recht erheblichen Abfälle der Fastgreen- und Sakaguchi-Anfärbbarkeit auf quantitative Unterschiede ihres Histon- und Arginingehaltes zurückzuführen (zumal die Ergebnisse mit dem breit erforschten Wirkungsmechanismus von Procarbazin in Einklang gebracht werden können), kann eine Abnahme der

Anfärbbarkeit auch bedingt sein durch eine Veränderung anfärbbarer Gruppen. Nach Noeske und Ebner (1965), die für steigende Fastgreen-Anfärbbarkeit bei hyperchromatischen Zellen eine Strukturänderung der basischen Kernproteine mit Freisetzung acidophiler Gruppen verantwortlich machen, könnten unsere Befunde der verminderten Anfärbbarkeit so gedeutet werden, daß Procarbazin eine Umstrukturierung der Histone in der Weise verursacht, daß weniger fastgreenfärbbare Gruppen frei sind.

Gledhill et al. (1966) beobachten über die schon angeführten histochemischen Veränderungen während der Spermiogenese hinaus, die einen besonders starken Anstieg der Bromphenol-Anfärbbarkeit (Färbung für Nucleohiston) der Hodenspermatozoen gegenüber den gestreckten Spermatiden ergaben, eine noch stärkere Bromphenol-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen gegenüber den Hodenspermatozoen. Diese an Bullenspermatozoen gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Steigerung der Anfärbbarkeit von Hoden zu Nebenhoden um 12 %.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht unser Befund, daß die Nebenhodenspermatozoen nicht nur der Kontrollreihe, sondern auch der behandelten Reihen eine stärkere Fastgreen-Anfärbbarkeit zeigen als die entsprechenden Spermatozoen des Hodens. Die Nebenhoden-Spermatozoen der Kontrollreihe stellen sich im Mittel um ca. 20 % stärker anfärbbar dar. Im Gegensatz zu dem in der gleichen Arbeit an insgesamt 40 Spermatozoen von 4 Bullen erhobenen Befund der ganz schwach stärkeren oder gleichbleibenden Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen gegenüber den Hodenspermatozoen, steht unser Befund, daß die Spermatozoen des Nebenhodens in den meisten Fällen signifikant geringere Sakaguchi-Anfärbbarkeit zeigen als die des Hodens.

Kurtz und Sinex (1967) berichten, daß das Histon/DNS-Verhältnis eine Altersabhängigkeit zeigt. Der Proteinanteil des Chromatins im

Hirngewebe von Mäusen sinkt mit zunehmendem Alter der Tiere von zunächst 82,1 % (3 Tage alte Tiere) auf 61,0 % (6. Lebensmonat). Diese Ergebnisse auf das Spermium übertragen würden die von uns festgestellten terminalen Abfälle der Fastgreen- und Sakaguchi-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen erklären, zumal die von uns verwendeten Tiere altersmäßig exakt in dem Zeitraum liegen, in dem Kurtz und Sinex den Proteinabfall beschreiben.

## CYTOPHOTOMETRIE II

### Besprechung und Diskussion Naphthol-Yellow-Färbung für Gesamtproteine

#### I. Besprechung Hoden

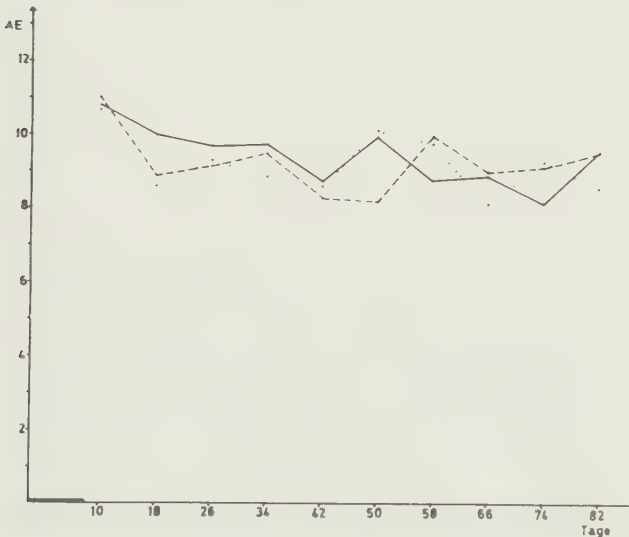


Fig. 18: Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeit der Hodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen. (— Kontrolle, ···· 3,3 TE, ---- 10 TE); Tage nach Injektionsbeginn

Alle drei Kurven verlaufen statistisch parallel, die Versuchsreihen zeigen zu gleichen Zeitpunkten keine signifikanten Abweichungen. Auch die zeitlichen Unterschiede innerhalb einer Reihe sind rar an Signifikanzen, nämlich in der Kontrolle ist der 10. Tag zum 74. Tag, in der stark gespritzten 10 TE - Reihe sind die beiden Tiefpunkte am 42. und 50. Tag signifikant gegenüber dem Ausgangswert am 10. Tag nach Injektionsbeginn.

## II. Besprechung Nebenhoden

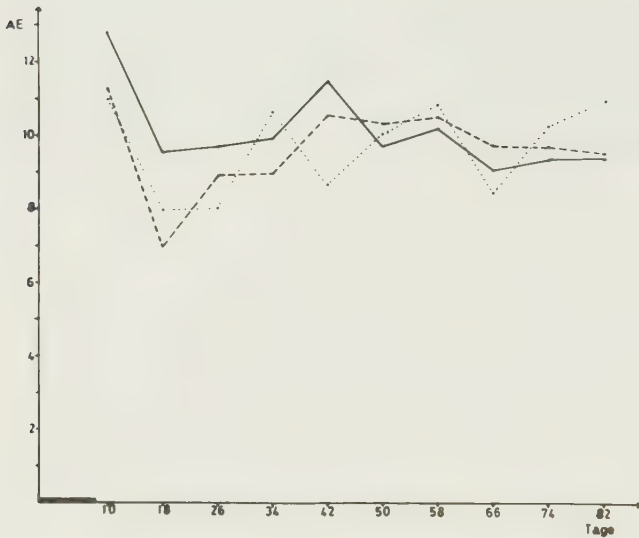


Fig. 19: Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen ( — Kontrolle, .... 3,3 TE, ---- 10 TE); Tage nach Injektionsbeginn

Der Nebenhoden bietet bezüglich der Versuchsreihenunterschiede und der Parallelität der Kurven die gleichen Aspekte wie der Hoden. Zeitliche Unterschiede zeigt nur die Kontrollreihe, nämlich am 10. Tag gegenüber den 3 Schlußtagen, die aber sonst nicht vom übrigen Kurvenbild abweichen. Die Procarbazin - Reihen haben keine signifikanten Abweichungen. In der 10 TE - Reihe des Nebenhodens fällt am 18. Tag eine sehr geringe Anfärbbarkeit auf ( $\bar{x}$  6,97 AE); dieser Wert mußte aber schon aus den oben genannten Gründen aus der Gesamtvarianzanalyse wegfallen. Er unterscheidet sich nicht signifikant von den Werten am selben Tag (siehe Varianzanalyse 18. Tag).

### III. Besprechung: Vergleich Hoden / Nebenhoden

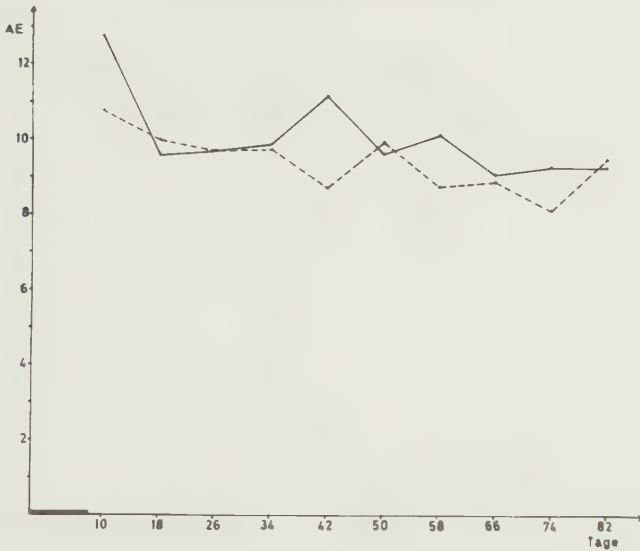


Fig. 20: Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeitsunterschiede (Kontrolle) ---- Hoden, — Nebenhoden

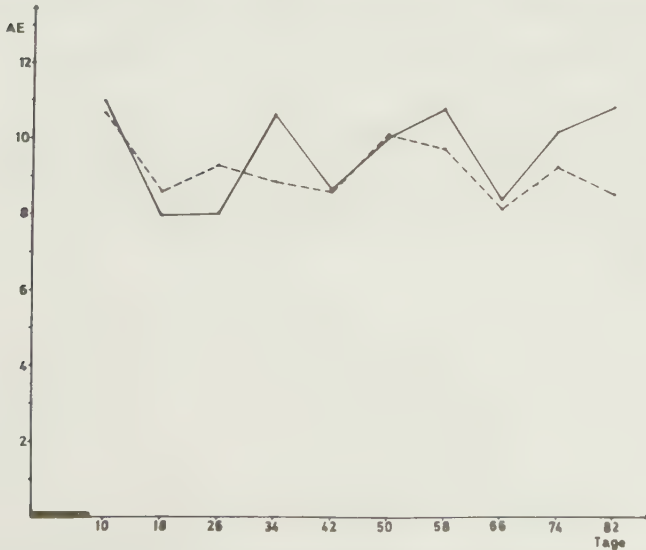


Fig. 21: Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeitsunterschiede (3,3 TE) ---- Hoden, — Nebenhoden

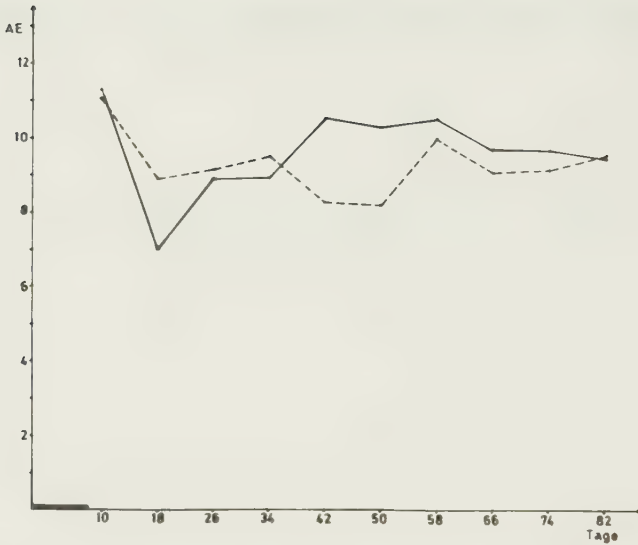


Fig. 22: Naphthol-Yellow-Anfärbbarkeitsunterschiede (10 TE)  
---- Hoden, — Nebenhoden

Im Gegensatz zu den Feulgenwerten für DNS ist hier das Kurvenbild völlig uneinheitlich: In allen 3 Versuchsreihen überschneiden sich die Kurven mehr oder weniger häufig. Meist liegen die Nebenhodenwerte über denen des Hodens, ohne daß sich eine Gesetzmäßigkeit daraus ablesen ließe. Bemerkenswert ist, daß nur dann Signifikanzen auftreten, wenn der Nebenhodenwert höher ist als der des Hodens.

#### IV. Diskussion der Naphthol-Yellow-Färbung

Aus den Ergebnissen und der Besprechung geht hervor, daß die von Deitch 1955 beschriebene Naphthol-Yellow-Färbung für Gesamtproteine praktisch keine Unterschiede zwischen den 3 Versuchsreihen aufweist. Wie Deitch 1962 bestätigt, werden bei dem Färbevorgang freie Lysin, Arginin- und Histidin - Gruppen angefärbt. Für das Spermium, das in der Reifungsphase einen Wechsel von Lysin - reichem zu Arginin - reichem Histon durchmacht, bedeutet das wahrscheinlich, daß eine Hemmung in diesem Vorgang durch die Färbung nicht aufgedeckt wird. Auch die Histonverminderung, die von uns zu einigen Zeitpunkten gefunden wurde, hat sich wohl auf Grund der Unspezifität der Färbung bzw. des kleinen Anteils der Histone am Gesamteiweiß (ca. 17 %) (Richard und Pardon 1970) nicht bemerkbar gemacht. Lediglich eine größere Gesamtproteinreduzierung hätte eine Verminderung der Anfärbbarkeit zur Folge.

Die Histon- und Argininwerte, die von uns gemessen wurden, stehen also nicht im Gegensatz zu den Gesamtproteinergebnissen.

## Besprechung und Diskussion Feulgenfärbung für DNS

### I. Besprechung Hoden

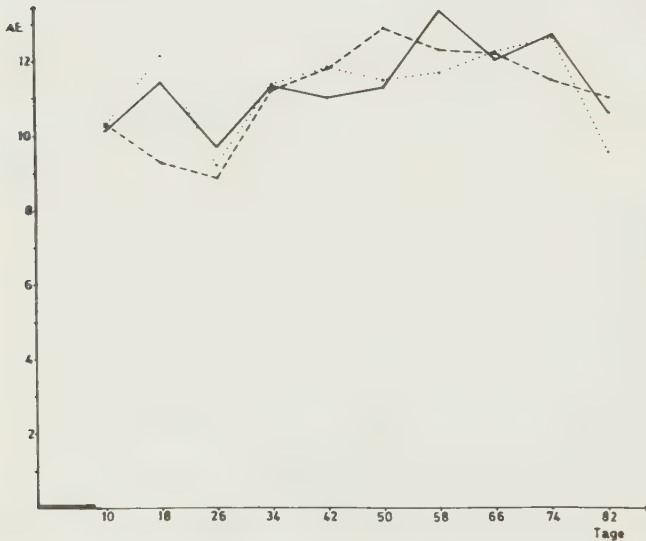


Fig. 23: Feulgenanfärbbarkeit der Hodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen ( — Kontrolle, .... 3,3 TE, --- 10 TE); Tage nach Injektionsbeginn

Alle 3 Kurven verlaufen statistisch gesehen parallel; es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsreihen zu gleichen Zeitpunkten nachzuweisen. Die Spermatozoenanfärbbarkeit aller 3 Versuchsreihen besitzt am 26. Tag nach Injektionsbeginn ihren Tiefpunkt, der innerhalb der jeweiligen Kurven teilweise signifikant von den übrigen Tagen abweicht.

## II. Besprechung Nebenhoden

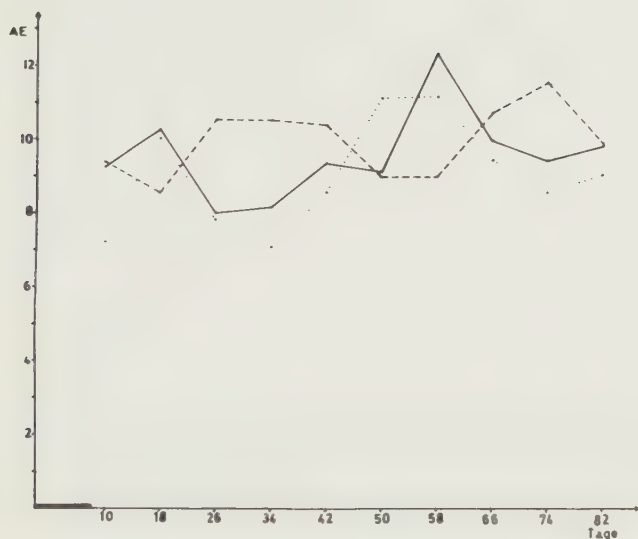


Fig. 24: Feulgenanfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen in den 3 Versuchsreihen (— Kontrolle, .... 3,3 TE, --- 10 TE); Tage nach Injektionsbeginn

Im Gegensatz zu den Feulgenwerten vom Hoden treten im Nebenhoden Signifikanzen ( $P = 1\%$ ) zwischen den 3 Versuchsreihen auf. Sie kommen hauptsächlich zwischen der 3,3 TE - und der 10 TE - Kurve vor (am 26., 34., 74. Tag), da jene mit Ausnahme des 50. Tages grundsätzlich unter der Kontrollkurve verläuft, allerdings parallel zu dieser. Die 10 TE - Kurve besitzt im ganzen gesehen eine gegensinnige Tendenz im Vergleich zu den beiden anderen Kurven, was sich statistisch zwischen dem 42. und 50. Tag bzw. 58. und 66. Tag nach Injektionsbeginn in je einem Parallelitätsabbruch dieser Kurve niederschlägt. Die zeitlichen signifikanten Abweichungen betreffen nur die Kontroll- und die 3,3 TE - Reihe, wobei in der Kontrolle der 26. und 34. Tag gegenüber dem 58. Tag, bei 3,3 TE der 10. und 34. Tag gegenüber dem 50. und 58. Tag statistisch gesicherte Unterschiede besitzen.

### III. Besprechung: Vergleich Hoden / Nebenhoden

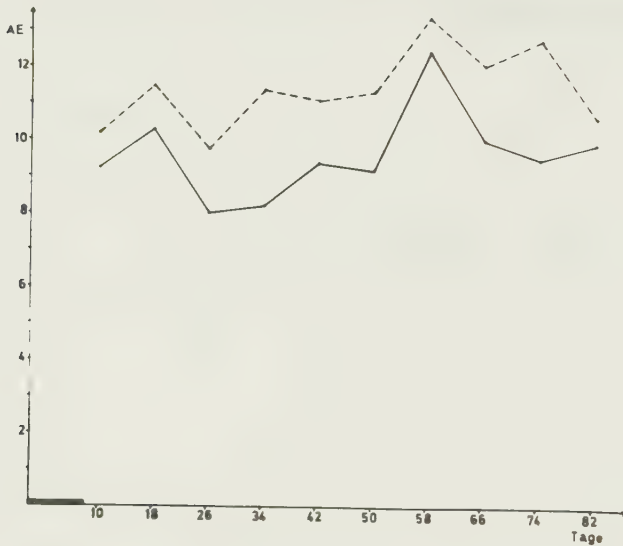


Fig. 25: Feulgen-Anfärbbarkeitsunterschiede (Kontrolle)  
----- Hoden, — Nebenhoden

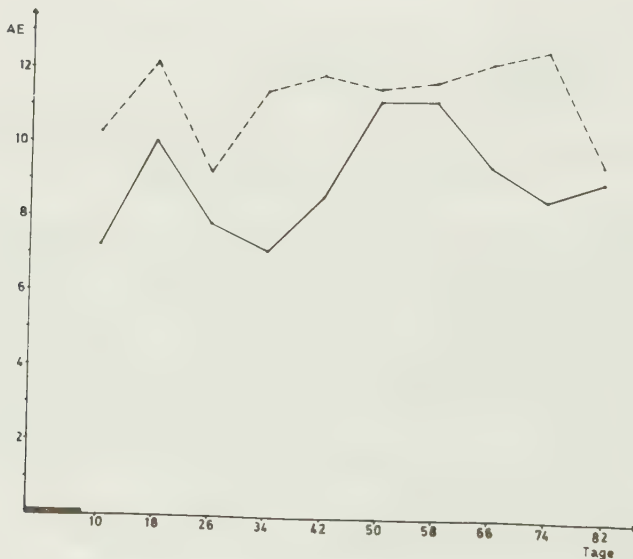


Fig. 26: Feulgen-Anfärbbarkeitsunterschiede (3,3 TE)  
----- Hoden, — Nebenhoden

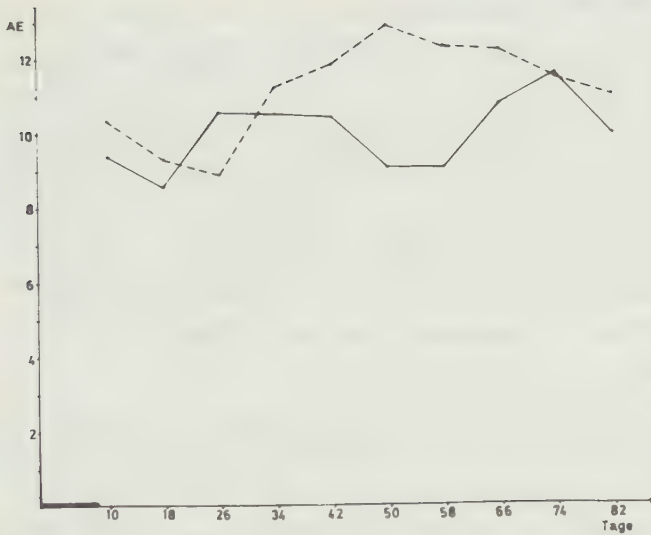


Fig. 27: Feulgen-Anfärbbarkeitsunterschiede (10 TE)  
---- Hoden, — Nebenhoden

Auf den ersten Blick fällt auf, daß bei der Kontrolle und fast noch deutlicher bei 3,3 TE die Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen immer kleinere Werte zeigt als die des Hodens. Die stark gespritzte 10 TE - Reihe zeigt dagegen an zwei Tagen (am 26. und 74. Tag) den umgekehrten Fall. Bemerkenswert ist die Zahl der Signifikanzen bei den einzelnen Reihen im Vergleich Hoden / Nebenhoden. Die nachstehende Tabelle zeigt, daß vor allem die 10 TE - Reihe eine sehr niedrige Anzahl von Signifikanzen zwischen beiden Lokalisationen aufweist.

|                           | Kontrolle | 3,3 TE | 10 TE |
|---------------------------|-----------|--------|-------|
| Ø H. -NH.                 | 1,77      | 2,22   | 1,51  |
| Zahl der<br>signif. Usch. | 4         | 6      | 2     |

#### IV. Diskussion der Feulgenfärbung

Bei den Ergebnissen fällt in der 10 TE - Reihe am 26. Tag (kaum am 74. Tag) beim Hoden / Nebenhoden - Vergleich eine starke Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen auf, deren Durchschnittswert über dem des Hodens liegt. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Werten der beiden anderen Versuchsreihen, bei denen zu allen Zeitpunkten ein Abfall der Feulgen-Anfärbbarkeit vom Hoden zum Nebenhoden beobachtet wird. Diese Reduzierung wird, wie nachfolgende Autoren beschreiben, bei normaler Spermatozoenreife gefunden.

Gledhill et al. (1966 b) bestimmten die Extinktion von Feulgen - gefärbten Bullenspermatozoen und stellten einen signifikanten Abfall vom Hoden zum Nebenhoden fest, der bei den vergleichenden UV - mikrospektrometrischen Werten nicht auftrat. Bouters et al. (1967) erhielten ähnliche Ergebnisse beim Kaninchen. Daraus schlossen beide Autoren, daß der DNS - Gehalt nicht quantitativ abnimmt, sondern daß der Komplex DNS - basisches Protein (DNP) sich im Sinne einer Kondensation des Chromatins oder, anders formuliert, einer Festigung des Komplexes ändert, was weniger freie Farb-Bindungsstellen zur Folge hat (Gledhill 1970). Ähnliche Versuche beim Bullen unternahm Darzynkiewicz (ein Mitarbeiter Gledhills) (1969) mit markiertem  $^3\text{H}$  - Actinomycin D, das sich in normalen Testisspermatozoen mehr am Zellchromatin anreicherte als in ejakulierten Spermatozoen. Gledhill et al. fanden dann 1971, daß  $^3\text{H}$  - Actinomycin D in mißgestalteten Spermienköpfen in größerer Konzentration vorhanden war als in normalen. Die gleiche Gruppe konstatierte 1970 im Laufe der Spermienreife eine größer werdende Hitzestabilität des DNP - Komplexes. Daoust und Clermont hatten schon 1955 eine vollständige Resistenz gegen DN - ase-Einwirkung im Spätstadium der Spermiogenese (= Reifung des Spermatis zum Spermatozoon) festgestellt.

All diese Befunde deuten "wahrscheinlich" (Gledhill 1970 a) auf irgendeine Änderung des DNP - Komplexes während der Spermienreifung hin. Da in unserer Kontroll- und in der 3,3 TE - Reihe zu allen Zeitpunkten zum Teil signifikante, höhere Hodenwerte als entsprechende Nebenhodenwerte auftreten, läßt die Konstellation am 26. Tag eine Schädigung dieses Komplexes durch Procarbazin vermuten. Auch zu den anderen Zeitpunkten, besonders vom 10. bis 42. Tag, sind die Differenzen in der stark gespritzten Reihe durchschnittlich am geringsten.

Die starke Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen am 26. Tag setzt sich auch noch am 34. Tag fort; sie ist an beiden Tagen gegen die 3,3 TE - Reihe signifikant und auch gegenüber der Kontrolle nahe der Signifikanzgrenze. Gledhill (1966 c) stellte bei infertilen Bullen im Nebenhoden eine hoch signifikante Erhöhung der Feulgen - Anfärbbarkeit gegenüber einer Kontrolle fest, wobei die entsprechenden mit dem UV - Mikrospektrophotometer ermittelten Werte keine Signifikanz zeigten. Daraus schloß er ebenfalls auf einen qualitativen Defekt im Spermatozoonkopf. Im Gegensatz zu den Untersuchungen Gledhills fand Meyhöfer (1960, 1961, 1963) in Ejakulaten subfertiler oder infertiler Männer in der Regel deutlich verminderte UV - mikrospektrophotometrische Werte in mißgestalteten Spermienköpfen und konnte diese Reduzierung 1963 bei parallelen Feulgenmessungen bestätigen. Diese Konstellation sprach für einen quantitativen DNS - Verlust im Spermium. Leuchtenberger et al. hatten schon 1956 bei verminderten Feulgenwerten von Spermatozoen infertiler Männer einen ähnlichen Schluß gezogen. Solche Befunde ließen sich in unserem Versuch nicht erheben.

Die starke Anfärbbarkeit spricht also für einen Defekt des DNP - Komplexes; sie kann auch durch eine simultane Histonverminderung hervorgerufen werden, die am 26. Tag tatsächlich vorhanden war. Diese Konstellation: Hoher Feulgenwert / niedriger Histonwert und umgekehrt beschrieb Sibatani (1962) bei in vitro - Versuchen. Die

Beziehungen zwischen beiden Färbungen wurden im allgemeinen durch unsere Messungen bestätigt, was besonders aus dem Lokalisationsvergleich hervorgeht.

Da die genannten Veränderungen erst am 26. bzw. 34. Tag auftraten und im Nebenhoden lokalisierbar waren, zu dessen Erreichen die Spermien vom Hoden aus ca. 7,5 Tage (Sirlin 1957) benötigen, läßt sich retrospektiv die Schädigung durch Procarbazin in diesem Fall auf die meiotische Prophase der Spermatozyten 1. Ordnung projizieren (Oakberg 1956 b).

Die Komplexschädigung des DNP, die gleichbedeutend mit einer Reifungshemmung ist, kann nach Gledhill 1970 b theoretisch durch 3 Mechanismen zur Infertilität führen oder zumindest beitragen:

1. durch eine leichtere Verwundbarkeit des zu lose gepackten DNP - Komplexes gegenüber äußeren Einflüssen z.B. Enzymen,
2. durch eine Störung bei der Vereinigung beider Pronuclei,
3. durch ein sofortiges Absterben der Zygote infolge des atypischen väterlichen Komplexes.

Die Frage der Infertilität durch Procarbazin soll aber erst in der gemeinsamen Diskussion an Hand des Reproduktionsversuchs erörtert werden.

Zusätzliche direkte oder indirekte Schädigungen der molekularen DNS, z.B. Spaltung in Bruchstücke, Chromatidbrüche, Synthesestörung durch Hemmung von Enzymen oder Metaboliten (Rutishauser und Bollag 1963, Berneis et al. 1963, Weitzel et al. 1968), sind mit der Feulgenfärbung nicht erfaßbar, sind aber durchaus möglich.

Als Nebenfunde traten bei unserem Versuch zum Teil signifikante Individualschwankungen innerhalb der Reihen auf, wie sie auch von anderen Autoren beschrieben werden (Bouters et al. 1967, bei Kainichen - Ejakulaten (Feulgen - Färbung); Leidl und Stolla 1969 bei Keilern (UV - Mikrospektrophotometrie)).

## REPRODUKTIONSVERSUCH

Die Ergebnisse des 1. und 2. Reproduktionsversuchs zeigen, daß die Zahl der Nachkommenschaft der mit Procarbazin behandelten Mäuse deutlich geringer ist als die der Kontrollreihen, und daß dabei gegen Ende der Beobachtungszeit aus der Paarung mit behandelten Böcken wieder normale Wurfgrößen hervorgehen.

Bei der 10 - TE - Reihe liegt die Durchschnittswurfgröße bis inklusive 58. Tag, 1. und 2. Reproduktion zusammengefaßt, bei 3,2 Jungen pro Wurf, bei der 3,3 TE - Reihe bei 8,7 Jungen pro Wurf. Die Kontrolltiere dagegen haben in demselben Zeitraum eine durchschnittliche Nachkommenschaft von 11,2 Tieren.

Während im 1. Reproduktionsversuch (Fig. 28) bei der 10 TE - Reihe zu Beginn der Beobachtungszeit am 10. und 18. Tag neben infertilen Böcken noch solche mit reduzierter Fertilität auftreten, sind am 26. und 34. Tag sämtliche Tiere infertil. Dieser Periode folgt mit dem 42. und 58. Tag eine Zeit, in der die Böcke wieder neben totaler Infertilität auch reduzierte Fertilität zeigen.

In der 3,3 TE - Reihe der 1. Reproduktion treten infertile Böcke erst am 26., 34. und 42. Tag auf. In dieser Versuchsreihe sind bis zu diesem Tag 3 von 10 Böcken infertil, während sich in der 10 TE - Reihe in demselben Zeitraum 7 von 10 Böcken als infertil erweisen.

Die 2. Reproduktion (Fig. 29) zeigt die Fertilität derselben Tiere 8 Tage später. Hatten die beiden Böcke am 18. Tag noch eine Durchschnittswurfgröße von 4, so weisen sie am 26. Tag keine Nachkommenschaft mehr auf. Die im 1. Reproduktionsversuch 8 Tage vorher infertilen Böcke zeigen im 2. Reproduktionsversuch am 34. und 42. Tag ebenfalls Infertilität. Eine Fertilitätssteigerung mit  $P = 5\%$  ist bei denselben Tieren vom 42. Tag ( $\emptyset$  3 Junge) zum 50. Tag ( $\emptyset$  9 Junge) zu verzeichnen. Ab 66. Tag (58. Tag wurde

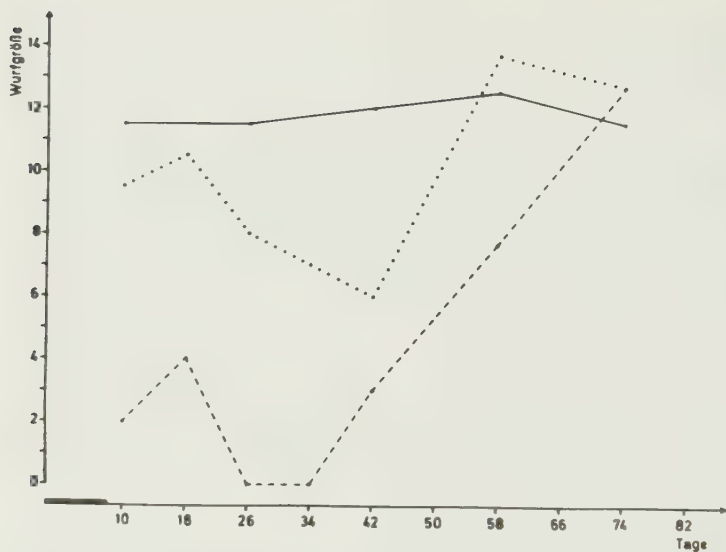


Fig. 28: 1. Reproduktionsversuch ( — Kontrolle, .... 3,3 TE, ---- 10 TE)

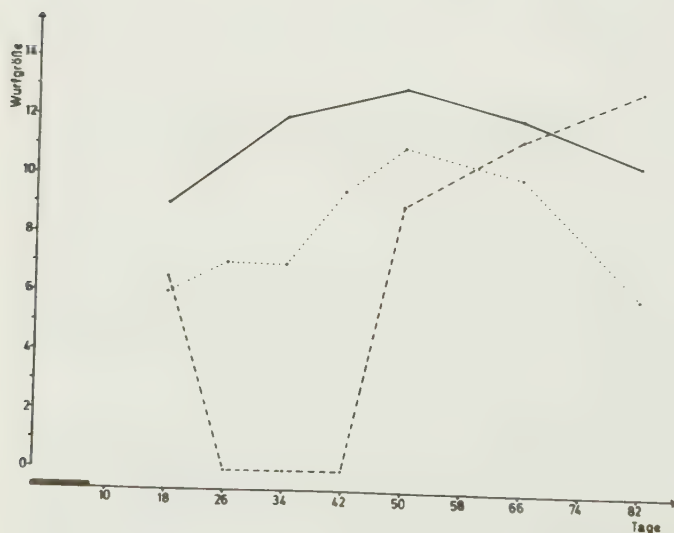


Fig. 29: 2. Reproduktionsversuch ( — Kontrolle, .... 3,3 TE, ---- 10 TE)

nicht bestimmt) ist auch hier die durchschnittliche Wurfgröße unauffällig.

Die Mäuseweibchen, die mit Böcken der 3,3 TE- und 10 TE-Reihe gepaart wurden und aus deren achttägiger Paarung kein oder nur ein kleiner Wurf hervorging, zeigten bei Paarung mit fertilen Böcken (Böcke aus Kontrollreihe mit normaler Durchschnittsnachkommenschaft) Wurfgrößen im Normbereich.

## GESAMTDISKUSSION

Die von uns gefundene Fertilitätsminderung in der 10 TE - Reihe (vollständige und unvollständige Infertilität) während der ersten 5 Entnahmezeiten läßt den Schluß auf eine durchgehende Schädigung von A - Spermatogonien bis elongierten Spermatiden zu. Die Erklärung dieses Effekts kann in der Tat durch unsere histologischen und cytophotometrischen Untersuchungen erbracht werden.

Die vom 26. bis 42. Tag auftretende Infertilität steht in Einklang mit dem histologischen Befund der Verminderung der elongierten Spermatiden am 26. und 34. Tag im Hoden (in geringerem Ausmaß auch am 18. Tag, Fig. 1), da die Passagezeit der Spermatozoen von Hoden zum Nebenhoden nach Sirlin et al. (1957) 7,5 Tage beträgt. Dem entspricht ein Procarbazineangriff im Bereich der Spermatogonien (Fig. 2 u. 3).

Cytophotometrisch fanden wir bei der Feulgenfärbung der Nebenhodenspermatozoen am 26. und 34. Tag eine vermehrte Anfärbbarkeit (Tab. 32).

In dem genannten Zeitraum der Infertilität wird ein verminderter Histongehalt am 18., 34., 42. und 50. Tag sowie ein verminderter Arginingehalt der Hoden- bzw. Nebenhodenspermatozoen am 10., bis inklusive 50. Tag gefunden. Diese Histon- und Argininreduzierung erscheint als Parameter auch für die am 10. und 18. Tag (evtl. am 50. Tag) auftretende vollständige bzw. unvollständige Infertilität, die mit den histologischen Ergebnissen nicht erklärbar ist, besonders geeignet. Sie kann als Reifungshemmung der Spermatiden interpretiert werden, die den Histonwechsel nicht haben vollziehen können. Davis und Langford (1970) deuten an, daß der Histonwechsel für ein befruchtungsfähiges Spermium notwendig ist.

Mehrere Untersuchungen über reduzierte Fertilität beim Menschen

(Leuchtenberger et al. 1953) und beim Bullen (Gledhill et al. 1966, Parez et al. 1960, Leuchtenberger et al. 1956) haben ebenfalls vermuten lassen, daß diese eventuell auf einen defekten oder unreifen DNS - Protein - Komplex zurückgeführt werden kann.

Die unmittelbar nach Procarbazinbehandlung einsetzende und bis zum 42. / 50. Tag bestehende Infertilität ist nur in der 2. Hälfte von morphologischen Veränderungen in Form der Spermatozoenverminderung begleitet und entsprechend zu deuten. Jackson (1964) spricht bei Infertilität trotz quantitativ und morphologisch unveränderter Spermatozoen in Hoden und Nebenhoden von "functional impairment of spermatogenesis". Er erhob diesen Befund nach TEM - Behandlung bei der Ratte.

Unsere cytophotometrische Untersuchungsmethode an Hoden - und Nebenhodenspermatozoen war imstande, auch für die 1. Hälfte des infertilen Zeitraumes Störungen in Form einer zeitweise gesteigerten Feulgenanfärbbarkeit im Nebenhoden und einer Abnahme von Histon- und Arginingehalt nachzuweisen.

Die deutlich herabgesetzten Wurfgrößen nach 3,3 TE mit den recht hohen individuellen Schwankungen legen den Schluß nahe, daß einerseits die Grenze zur Keimzellschädigung - wenn auch mit erheblichen Variationen von Tier zu Tier - mit dieser Dosis schon klar überschritten ist und andererseits auch hier die mit der verhältnismäßig groben histologischen Methodik selten faßbaren Defekte als Histon- und als Argininverminderung durch die cytophotometrische Methodik eine Erklärung finden.

## INTERTUBULÄRE STADIENKOORDINATION

Bei der Bestimmung der Spermatogenesestadien fiel auf, daß benachbarte Tubuli sich wider Erwarten häufig im selben oder einem benachbarten Stadium befanden (Abb. 13).

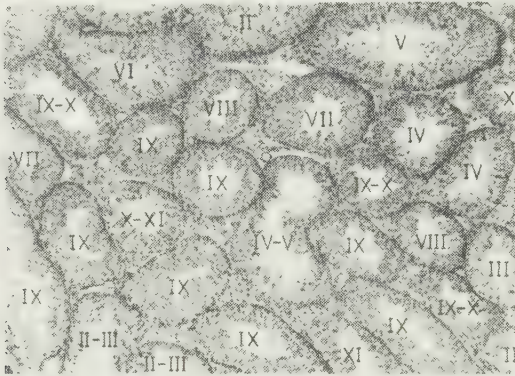


Abb. 13:  
Stadienübereinstimmung

Wenn zunächst das Stadium eines quergeschnittenen Tubulus bestimmt worden ist und danach einer der angrenzenden, ebenfalls quergeschnittenen Tubuli zufällig ausgewählt wird, so ist - bei 12 alternativen Stadien - für diesen zweiten Tubulus mit einer Wahrscheinlichkeit von  $1/12$  zu erwarten, daß er dasselbe Stadium besitzt - gleichgültig welches - wie der erste Tubulus. Zwei benachbart liegende, quergeschnittene Tubuli, also ein "Paar", sind demnach mit einer Wahrscheinlichkeit (Prob) von  $1/12$  im selben Stadium - vorausgesetzt, keiner der benachbarten Tubuli ist mit dem Ausgangstubulus identisch, d.h. der Ausgangstubulus darf nicht nach einer Wendung um  $180^\circ$  rückläufig in benachbarter Position wieder erscheinen.

Daraus ergibt sich das anatomische

Modell I: Tubulusverlauf immer parallel



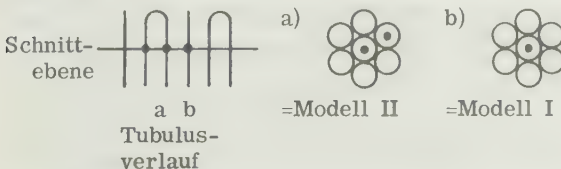
Als äußerste Alternative zu diesem Modell ist denkbar, daß jeder Tubulus außerhalb der senkrecht zu ihm verlaufenden Schnittebene, aber in genügend kleinem Abstand eine Kehre um  $180^{\circ}$  vollzieht und als Nachbartubulus in der Schnittebene wieder auftaucht. Dabei wird unterstellt, daß dieser Tubulus in beiden Querschnitten dasselbe Stadium aufweist, daß also das Stadium in der außerhalb des Schnittes liegenden Schleife nicht gewechselt hat. Daraus folgt, daß einer der sechs umliegenden Tubuli - in aller Regel ist ein querschnittener Tubulus jeweils von sechs anderen umgeben (vgl. auch Müller, 1957, Hundeiker, 1970) - in demselben Stadium sein muß wie der Ausgangstubulus. Die Wahrscheinlichkeit für diesen einen Tubulus ausgewählt zu werden ist  $1/6$ ; für jeden der fünf anderen Tubuli gilt auch hier die Wahrscheinlichkeit von  $1/12$ , mit der er das Stadium des Ausgangstubulus aufweist. Daraus ergibt sich

Modell II: Tubulusverlauf immer mit Schleife



Alle anderen anatomischen Möglichkeiten müssen sich zwischen diesen beiden Modellen bewegen - je nachdem, wie hoch der Anteil der Tubuli mit und der ohne Schleife ist. Nehmen wir nun an, daß jeder zweite Tubulus diese  $180^{\circ}$ -Kehre vollzieht, dann gehören von jeweils drei Tubulusquerschnitten zwei zu dem Tubulus mit Schleife; der dritte verläuft gerade. Daraus folgt

Modell III: Tubulusverlauf alternierend mit/ohne Schleife



$$\text{Prob III} = (2a + b)/3 = (2 \text{ Prob II} + \text{Prob I})/3 = \underline{1/5, 4}$$

Damit wird es möglich, bei Kenntnis des anatomischen Modells, die zu erwartende Häufigkeit von Paaren aus benachbart liegenden Tubulusquerschnitten mit übereinstimmenden Stadien mit der tatsächlichen Häufigkeit zu vergleichen.

Praktisch wurde so vorgegangen: Auf den Fotomontagen der Hodenschnitte (Abb. 1) wurden zunächst die Tubuli, deren Stadien bestimmt werden sollten, nach folgenden Kriterien ausgewählt: 1. Sie mußten quergeschnitten sein. 2. Sie sollten möglichst in Folge nebeneinander liegen. 3. Nicht mehr als zwei Tubuli sollten so zueinander liegen, daß jeder zu jedem benachbart war. Die Summe aller möglichen Kombinationen nebeneinander liegender Tubuli (Paare) wurde festgestellt. (Aus  $n$  benachbarten Tubuli in einer Folge lassen sich  $n-1$  Paare bilden.)

Nach Bestimmung der Spermatogenesestadien aller Tubuli wurde untersucht, wie viele dieser Paare Tubuli mit übereinstimmenden Stadien aufwiesen und wie viele Paare Tubuli mit Nachbarstadien.

In der Kontrollreihe wurden von 717 Paaren 133 mit Stadienübereinstimmung ihrer Tubuli und 141 mit "Stadiennachbarschaft" gefunden; d. h. die Häufigkeit ( $H$ ) der Stadienübereinstimmung betrug  $1/5,39$  mit einem 95 %-Vertrauensbereich von  $(H+2s=) 1/4,67$  bis  $(H-2s=) 1/6,39$ . Sie stimmt also präzise mit der für das anatomische Modell III berechneten Wahrscheinlichkeit überein. Folglich ist zu prüfen, ob tatsächlich in den ausgewerteten Hoden jeder zweite Tubulus eine Wendung um  $180^{\circ}$  vollzieht.

Auch dazu konnten die Fotomontagen verwendet werden, denn wenn außerhalb der Schnittebene die quergeschnittenen Tubuli in Schleifen verlaufen, dann müssen innerhalb der Schnittebene die längsgeschnittenen Tubuli ebenso häufig Schleifen aufweisen - vorausgesetzt, die Schnitte erfolgten in zufällig wechselnder Richtung. Sichtbar werden jedoch nur die Wendungen, bei denen sich der Tubulusverlauf nicht um mehr als  $60^{\circ}$  beiderseits aus der Schnittebene

herausdreht. Infolgedessen kann nur jede dritte Schleife auf der Fotomontage abgebildet sein.



Schnittebenenbereich, in dem die vom zentralen Tubulus ausgehenden Schleifen erfaßt werden

In der Kontrollreihe wiesen von 1154 längsgeschnittenen Tubuli 78 eine Schleife auf; demnach verliefen tatsächlich 234 Tubuli mit und 920 ohne Schleife. Ihre Relation beträgt somit  $1/3,93$  bei einem 95 %-Vertrauensbereich von  $1/3,57$  bis  $1/4,37$  und nicht, wie nach der Stadienübereinstimmung zu fordern, Modell III entsprechen  $1/1$ .

Bei diesen tatsächlichen anatomischen Verhältnissen von 1 Tubulus mit Schleife zu 3,93 Tubuli ohne Schleife gilt für die Wahrscheinlichkeit der Stadienübereinstimmung:

Prob. IV = (2 Prob II + 3,93 Prob I):  $5,93 = 1/7,41$ .

Daraus folgt, daß von den ausgewerteten 717 Paaren nur 96,8 - nicht aber 133 - sich aus Tubuli mit gleichem Stadium zusammensetzen dürften. Wendet man auf diese Werte den  $\chi^2$ -Test an, dann ergibt sich ein  $\chi^2$  von 13,5 bei einem Freiheitsgrad von 1.

Die tatsächlich gefundene Häufigkeit der Stadienübereinstimmung bei Tubuluspaaren unterscheidet sich also von der auf Grund der anatomischen Verhältnisse zu erwartenden Häufigkeit mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 0,1$  %.

In der 3,3 TE-Reihe zeigten von 443 Paaren 80 Stadienübereinstimmung und 108 "Stadiennachbarschaft". Stadienübereinstimmung trat demnach mit einer Häufigkeit von  $1/5,54$  auf ( $H+2s=1/4,61$ ;  $H-2s=1/6,94$ ). Sie stimmt sehr gut mit der der Kontrollreihe und damit auch der des Modells III überein.

Von den 1333 längsgeschnittenen Tubuli wiesen 88 Schleifen auf, d.h. 264 Tubuli verliefen tatsächlich mit Schleife und 1069 ohne,

d.h. ihre Relation beträgt  $1/4,05$  und nicht  $1/1$ . Auf der Basis dieses Tubulusverlaufs dürften nur 59,4 - nicht aber 80 - von 443 Paaren Tubuli mit gleichen Stadien aufweisen. Bei einem  $\chi^2$  von 7,1 und einem Freiheitsgrad von 1 bleibt die Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 1 \%$ .

In der 10,0 TE-Reihe wurde bei 90 von 382 Paaren Stadienübereinstimmung, bei 81 Paaren "Stadiennachbarschaft" registriert. Eines von 4,24 Paaren zeigte also Tubuli im selben Stadium ( $H+2s=3,58$ ;  $H-2s=5,20$ ). Diese Häufigkeit weicht etwas von der der anderen Reihen ab; dennoch überschneiden sich die 95 %-Vertrauensbereiche deutlich.

Von den 1055 längsgeschnittenen Tubuli wiesen 69 Schleifen auf, d.h. 207 Tubuli machten eine  $180^\circ$ -Wendung und 848 nicht. Ihre Relation deckt sich mit  $1/4,10$  gut mit denen der beiden anderen Reihen. Statt der 90 Paare mit Stadienübereinstimmung wären folglich bei insgesamt 382 Paaren nur 50,8 zu erwarten gewesen.  $\chi^2$  ist gleich 30,2; bei einem Freiheitsgrad von 1 ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 0,1 \%$ .

Bei den Tubuluspaaren mit gleichem Stadium traten in allen drei Reihen die einzelnen Stadien mit annähernd der gleichen Häufigkeit auf, wie sie auch bei den einzelnen Tubuli beobachtet wurde (Tab. 9). Die Stadienkoordination scheint sich demzufolge auf alle Stadien zu erstrecken.

Fehlerquellen der angewendeten Methode liegen sicher nicht in der recht präzise möglichen Stadienbestimmung, sondern sind eher bei der Untersuchung des Tubulusverlaufs zu suchen. Wenn nämlich die Tubuli auf den Hoden bezogen einer bestimmten räumlichen Ordnung folgend außerhalb der Schnittebene ihre Wendungen vollziehen, kann es sein, daß diese Schleifen nicht erfaßt worden sind. Ilse Müller hat 1957 für den Rattenhoden tatsächlich eine grobe Tubulusordnung beschrieben. Da aber in unserem Versuch die Mäusehoden

in zufällig wechselnder Richtung geschnitten wurden und dementsprechend in den Fotomontagen die Flächenanteile von quer- und längsgeschnittenen Tubuli dem Aspekt nach gleich groß waren, ist zu erwarten, daß auch die Schleifen in repräsentativer Häufigkeit beobachtet wurden.

Eine andere Überlegung stützt diese Annahme: Wenn die Tubuli auch bei der Maus - wie von Müller (1957) für die Ratte beschrieben - im Hodeninneren im wesentlichen gestreckt verlaufen und ihre Schleifen in Nähe der Organoberfläche zeigen (die Hodenschnitte scheinen mit ihrer regelmäßigen Anordnung von quer- und längsgeschnittenen Tubuli diese Organisation zu bestätigen), dann ist für den einzelnen Tubulus zu erwarten, daß er bei einer Hodengröße von ca. 7 mm Länge und 5 mm Breite jeweils nach 4 - 5 mm gestrecktem Verlauf eine Kehre beschreibt. Vergleicht man damit die Längen der auf den Fotomontagen abgebildeten längsgeschnittenen Tubuli, die zwischen 0,6 mm bei zahlreichen und 2,0 mm bei wenigen Tubuli schwankt, so daß ihr Durchschnitt kaum oder nur wenig über 1 mm liegen dürfte, dann ist tatsächlich nur ein Tubulus mit Schleife bei etwa vier ohne zu erwarten.

Angaben über die Längen der 12 Segmente (von einem Stadium eingenommener Tubulusabschnitt) bei der Maus existieren nicht. Für die Ratte haben Perey et al. (1961) durchschnittliche Längen von 0,4 bis 3,2 mm für die 14 Segmente angegeben. Davon abhängig ist die Häufigkeit, mit der im Verlauf einer Schleife von einem Tubulusquerschnitt bis zum zweiten ein Stadium in ein anderes übergeht. Da unterstellt wurde, daß in jedem Falle das Stadium erhalten bleibt, und dies ganz sicher nicht richtig ist, müßten Schleifen noch zahlreicher als in Modell III gefordert auftreten, um die häufige Stadienübereinstimmung erklären zu können.

Wenn aber der Tubulusverlauf als alleinige Ursache dieser Übereinstimmung ausscheidet, muß ein anderer Grund existieren.

Wollte man annehmen, daß die Koordination vom Beginn der Tubuli am Rete testis ausginge und das Stadium also von der dazwischen liegenden Tubulustrecke abhängig wäre, dann müßte die Stadienübereinstimmung am Übergang zum Rete testis besonders hoch sein. Da dies nach Perey et al. (1961) bei der Ratte nicht der Fall ist, darf diese Möglichkeit auch bei der Maus als unwahrscheinlich gelten.

Ebenso unwahrscheinlich ist eine nervale Steuerung, da einerseits keine Hinweise auf Nervenendigungen an Tubuli contorti bestehen (Hooker, 1970) und andererseits kaum einzusehen ist, warum eine solche Steuerung auf sehr kleine Hodenbezirke beschränkt sein sollte.

Damit bleibt als letzte Möglichkeit zur Erklärung die Existenz eines nur lokal wirksamen, humoralen Faktors, der entweder von den Tubuli contorti selbst oder dem Zwischengewebe sezerniert wird und - als eine Wirkung - den Spermatogeneseablauf koordiniert.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird über die Auswirkungen mehrmaliger Procarbazin - Applikation auf die Spermatogenese von Mäusen berichtet. Die Veränderungen wurden erfaßt mit Hilfe von histologischen Untersuchungen von Mäusehoden, cytophotometrischen Messungen an Hoden- und Nebenhodenspermatozoen derselben Tiere sowie durch Fertilitätsprüfungen im Rahmen eines Reproduktionsversuchs.

Für die histologischen und cytophotometrischen Untersuchungen dienten als Versuchsmaterial 20 unbehandelte, 20 mit 3,3 TE Procarbazin und 20 mit 10 TE Procarbazin behandelte Mäuseböcke. Der Beobachtungszeitraum betrug 82 Tage.

### Histologie

1. Aus den Befunden der 10 - TE - Reihe vom 10. und 18. Tag nach Behandlungsbeginn ergibt sich ein procarbazinempfindlicher Spermatogenesebereich sicher von den  $A_2$ - bis zu den Im-Spermatogonien. Wahrscheinlich aber werden zusätzlich späte  $A_1$ - und frühe B-Spermatogonien von Procarbazin angegriffen.
2. Das Ausmaß der Schädigung ist offenbar von der Anzahl der Injektionen abhängig, die in den empfindlichen Bereich fallen. Eine Injektion von 10 TE bewirkt demnach eine Verminderung der Zellen auf ca. 40 %; 4 bis 5 Injektionen führen zu praktisch vollständigem Verlust der empfindlichen Zellgenerationen.
3. Mindestens 80 % aller Tubuli sind von diesen Procarbazinwirkungen betroffen.
4. Der erste, noch unvollständige Regenerationsschub wird am 18. Tag sichtbar. Der zweite Regenerationsschub erreicht bereits das Ausmaß der Kontrollwerte. Am 50. Tag sind alle

Zellgenerationen vollständig regeneriert.

5. Die Tubuluswand reagiert auf 10 TE Procarbazin mit einer (signifikanten) Dickenzunahme vom 18. bis zum 34. Tag.
6. Vom 18. bis zum 26. Tag tritt in der 10 TE-Reihe eine temporäre Leydigzellhyperplasie auf, die als Folge eines negativen Rückkopplungsmechanismus interpretiert wird. Während der Abnahme der Hyperplasie erscheinen vermehrt degenerativ veränderte Leydigzellen.
7. Zwischen dem 18. und 50. Tag findet sich in der 3,3 TE-Reihe wie in der 10 TE-Reihe eine deutliche Hypervaskularisation, die sowohl durch eine Vasodilatation als auch durch eine Zunahme der absoluten Gefäßanzahl verursacht wird.

#### Cytophotometrie

44 386 Hoden- und Nebenhodenspermatozoen wurden cytophotometrisch untersucht auf Änderungen der Anfärbbarkeit der DNS (Feulgen-Färbung), der Histone (Fastgreen-Färbung), der Aminosäure Arginin (Sakaguchi-Färbung) und der Gesamtproteine (Naphthol-Yellow-Färbung).

1. Mit der Fastgreen-Färbung wurden 11 480 Spermatozoen (5.796 Hoden-, 5.684 Nebenhoden-) von insgesamt 59 Tieren untersucht.
  - a. Die Hodenspermatozoen der mit 10 TE Procarbazin behandelten Tiere zeigen am 18., 34., 42. und 50. Tag eine signifikant geringere Histonanfärbbarkeit. Eine signifikant geringere Anfärbbarkeit der 3,3 TE-Reihe wird zum gleichen Zeitpunkt, am 34., 42. und 50. Tag gefunden.
  - b. Die Nebenhodenspermatozoen stellen sich am 50. und 66. Tag als signifikant geringer anfärbbar dar.
  - c. Der Vergleich der Fastgreen-Anfärbbarkeit der Hoden- und Nebenhodenspermatozoen zeigt eine deutliche Häufung der Fälle

mit signifikant stärkerer Anfärbbarkeit der Nebenhodenspermatozoen (Kontrollreihe: 7 von 10 Meßtagen, 3,3 TE-Reihe: 8 von 10, 10 TE-Reihe: 6 von 10 Meßtagen). Eine signifikant höhere Anfärbbarkeit von Hodenspermatozoen tritt nicht auf.

2. Mit der Sakaguchi-Färbung wurden 10 856 Spermatozoen (5.690 Hoden-, 5.166 Nebenhoden-) von insgesamt 59 Tieren untersucht.
  - a. Die Hodenspermatozoen der 10 TE-Reihe zeigen eine signifikant geringere Anfärbbarkeit am 18., 26., 34., 42. und 50. Tag, die der 3,3 TE-Reihe am 26. und 50. Tag.
  - b. Die Nebenhodenspermatozoen zeigen eine signifikant geringere Argininanfärbbarkeit in der 10 TE-Reihe am 10., 26., 34., 42. und 50. Tag, die der 3,3 TE-Reihe am 10. und 34. Tag.
3. Mit der Naphthol-Yellow-Färbung wurden 10 760 Spermatozoen (5.424 Hoden-, 5.336 Nebenhoden-) von insgesamt 59 Tieren untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Versuchsreihen.
4. Mit der Feulgen-Färbung wurden 11 290 Spermatozoen (5.744 Hoden-, 5.546 Nebenhoden-) von insgesamt 59 Tieren untersucht.
  - a. Im Hoden stellten wir keine signifikanten Abweichungen zwischen den Versuchsreihen fest.
  - b. Im Nebenhoden traten signifikante Unterschiede am 26. und 34. Tag auf: Die Werte der 10 TE-Reihe waren zu diesen Zeitpunkten stark erhöht.
  - c. Im Hoden - Nebenhoden - Vergleich zeigt die 10 TE-Reihe ein z.T. abweichendes Verhalten im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsreihen (vor allem am 26. Tag).

#### Reproduktionsversuch

Für den Reproduktionsversuch standen 42 Mäuseböcke (10 unbehandelte, 16 mit 3,3 TE und 16 mit 10 TE Procarbazin behandelte) zur Verfügung; zusätzlich 84 Mäuseweibchen (unbehandelt). Jeder

Bock wurde zweimal für je 8 Tage mit einem Weibchen im Pro-oestrus zur Paarung zusammengesetzt.

Es wurde gezeigt, daß die Zahl der Nachkommenschaft der mit Procarbazin behandelten Mäuse deutlich geringer ist als die der Kontrollreihen, daß aber gegen Ende der Beobachtungszeit (ab 58. / 66. Tag) aus der Paarung mit behandelten Böcken wieder normale Wurfgrößen hervorgehen.

Die durchschnittlichen Wurfgrößen bis 58. Tag incl. sind:  
Kontrollreihe 11,2 Tiere, 3,3 TE 8,7 Tiere, 10 TE 3,2 Tiere.  
Während dieser Zeit werden neben völlig infertilen Böcken solche mit reduzierter Fertilität beobachtet.

Im 1. Reproduktionsversuch sind bis zum 42. Tag von 10 Tieren der 10 TE-Reihe 7 völlig infertil, 3 reduziert fertil, während die 3,3 TE-Reihe nur 3 völlig infertile Böcke aufweist. Nur infertile Böcke finden sich in der 10 TE-Reihe des 1. Reproduktionsversuchs am 26. und 34. Tag, im 2. Reproduktionsversuch am 26., 34. und 42. Tag.

Die beobachteten Veränderungen der Fertilität, die sich zeitlich mit den histologischen und cytophotometrischen Veränderungen decken, werden als deren Folge diskutiert. Histologisch wird als ursächlich eine Verminderung der elongierten Spermatiden am 26. und 34. Tag im Hoden, cytophotometrisch wird als ursächlich eine Reifungshemmung der Spermatiden diskutiert, die den Histonwechsel vom lysinreichen zum argininreichen Histon nicht haben vollziehen können.

## LITERATUR

- Albert, A. 1961 The mammalian testis Sex and Internal Secretions, Young, W.C. ed. Williams & Williams Baltimore, 3 rd ed. Vol. 1, 305
- Alfert, M. 1956 Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 109
- Alfert, M. 1957 Some cytochemical contributions to genetic chemistry. The chemical basis of hereditary. Ed. Wm. D. McElroy and B. Glass, John Hopkins Press Baltimore
- Benson, W.R., 1966 Regenerative changes and spermatogenic granu-  
Clare, F.S. lomas in the rat testis after treatment with dl - methionine.  
Am. J. Pathol. 49, 981
- Berneis, K., 1963 The degradation of deoxyribonucleic acid  
Kofler, M., by new tumour inhibiting compounds:  
Bollag, W., the intermediate formation of hydrogen  
Kaiser, A., peroxide.  
Langemann, A. Exper. 19, 132
- Bloch, D.P., 1960 Schedule of spermatogenesis in the pulmonate  
Hew, H.Y.C. snail *Helix aspera*, with special reference  
to histone transition.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 515
- Bloch, D.P., 1964 Evidence for the cytoplasmic synthesis in  
Brack, S.D. the grasshopper *Chortophaga veridifasciata*  
(de geer).  
J. Cell Biol. 22, 327
- Bollag, W. 1963 Exper. 19, 130  
Grünberg, E.
- Bollag, W., 1964 Symposium on the Chemotherapy of Cancer,  
Theiss, E. Elsevier, Publishing Company Amsterdam,  
London, New York
- Bollinger, A. 1970 Periphere Zirkulation. Klinische Pathophy-  
siologie, hrsg. W. Siegenthaler Thieme  
Verlag Stuttgart 563
- Bosse, H.G., 1969 Methodische Untersuchungen zur Cytophoto-  
Meyhöfer, W. metrie verschiedener Substanzen in mensch-  
lichen Spermatozoen. II. Europ. Sterilitäts-  
kongreß Dubrovnik (Jug.) 8. - 11.10.69.  
Referat Nr. 199

- Bouters, R., 1967 Discrepancies in analyses of deoxyribonucleic acid in rabbit spermatozoa, involving Feulgen staining (Feulgen - DNA) and ultraviolet light absorption (UV - DNA) measurements. *J. Reprod. Fert.* 14, 355
- Christensen, A.K. 1969 The correlation of the fine structure and function in steroid - secretion cells, with emphasis on those of the gonads. *The Gonads*, ed. by K.W. McKerns North Holland Publishing Company 415
- Gillim, S.W.
- Clegg, E.J. 1961 Further studies on artificial cryptorchidism: Quantitative changes in the interstitial cells of the rat testis. *J. Endocrinol.* 21, 433
- Clermont, Y., 1968 Re - examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am. J. Anat.* 122, 237
- Bustos-Obregon, E.
- Clermont, Y., 1969 Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-Thymidin and Radio-autography. *Fert. Steril.* 20, 805
- Trott, M.
- Cooper, E.R.A., 1970 Comparative effects of methylene, ethylene and propylene dimethanesulfonates on the male rat reproductive system. *J. Reprod. Fertil.* 23, 108
- Jackson, H.
- Courot, M., 1970 Spermatogenesis. *The Testis* I ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L. Vandemark. Academic Press, N.Y., London, 339
- Hochereau-de Reviers, M.T.,
- Ortavant, R.
- Daoust, R. 1955 Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 96, 255
- Clermont, Y.
- Darzynkiewicz, Z. 1969 Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. 3H - actinomycin D binding capacity. *Exptl. Cell Res.* 58, 435
- Gledhill, B.L.,
- Ringertz, N.R.
- Das, C.C., 1964 Histone - protein transition in *Drosophila melanogaster*. I. Changes during spermatogenesis. *Exptl. Cell Res.* 35, 507
- Kaufmann, B.P.,
- Gray, H.

- |                                                                                   |      |                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Davis, J.R.,<br>Langford, G.A.                                                    | 1970 | Testicular proteins, The Testis II,<br>ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L.<br>Vandemark. Academic Press N.Y.<br>London, 259                                                                                        |
| Deitch, A.D.                                                                      | 1955 | Microspectrophotometric study of the binding<br>of the anionic dye naphthol yellow S, by<br>tissue sections and by purified protein.<br>Lab. Invest. 4, 324                                                       |
| Deitch, A.D.                                                                      | 1962 | An evaluation of naphthol - yellow cytophoto-<br>metry and photometric interferometry<br>J. Histochem. 10, 649                                                                                                    |
| Druckrey, H.,<br>Steinhoffer, M.,<br>Nakayama, M.,<br>Preußmann, P.,<br>Anger, K. | 1963 | Dtsch. med. Wschr. 631 u. 715                                                                                                                                                                                     |
| Eik-Nes, K.B.                                                                     | 1964 | On the relationship between testicular blood<br>flow and secretion of testosterone in<br>anesthetized dogs stimulated with human<br>chorionic gonadotropin.<br>Canad. J. Physiol. Pharmacol. 42, 671              |
| Eik-Nes, K.B.                                                                     | 1967 | Factors influencing the secretion of the<br>testosterone in the anesthetized dog.<br>Ciba Foundation, Colloquia on Endocrinology<br>Vol. 16 the testis, 120                                                       |
| Ellis, L.C.<br>Berliner, D.L.                                                     | 1969 | Alterations in testicular androgen biosynthesis<br>as related to changes in spermatogenesis<br>induced by ionizing radiation.<br>The Gonads, ed. K.W. Mc Kerns North<br>Holland Publishing Company Amsterdam, 739 |
| Fahmy, O.G.<br>Fahmy, M.J.                                                        | 1969 | The genetic effects of the biological<br>alkylating agents with reference to<br>pesticides.<br>Ann. N.Y. Acad. Science 160, 228                                                                                   |
| Fölsch, E.,<br>Drewe, J.,<br>Grunze, H.                                           | 1964 | Verh. dtsch. Ges. Inn. Med.<br>70, 995                                                                                                                                                                            |
| Fox, B.W.<br>Fox, M.                                                              | 1967 | Biochemical aspects of the actions of drugs<br>on spermatogenesis.<br>Pharmacol. Rev. 19, 21                                                                                                                      |
| Fox, B.W.<br>Jackson, H.                                                          | 1965 | In vivo effects of methylene dimethanesulfonate<br>on proliferating cell systems.<br>Brit. J. Pharmacol. 24, 24                                                                                                   |

- Franchimont, P. 1970 L'exploration de l'axe hypothalamo - hypophyso - gonadique.  
Rev. Fr. Endocrinol. Clin. 11, 121
- Gay, V.L., 1969 Response of the adult rat to orchidectomy  
Midgeley, A.R. jr. and ovariectomy as determined by LH -  
radioimmunoassay  
Endocrinology 84, 1359
- Gledhill, B.L. 1966b Studies on the DNA content, dry mass and  
optical area of bull spermatozoal heads  
during epididymal maturation.  
Acta vet. scand. 7, 131
- Gledhill, B.L. 1966c Studies on the DNA Content, dry mass and  
optical area of ejaculated spermatozoal  
heads from bulls with normal and lowered  
fertility.  
Acta vet. scand. 7, 166
- Gledhill, B.L. 1970 Nucleic acids of the testis The Testis II  
ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L.  
Vandemark. Academic Press N.Y.  
London, 307
- Gledhill, B.L., 1971 Changes in deoxyribonucleoprotein during  
Darzynkiewicz, Z., spermiogenesis in the bull: Increased 3H -  
Ringertz, N.R. actinomycin D binding to nuclear chromatin  
of morphologically abnormal spermatozoa.  
J. Reprod. Fert. 26, 25
- Gledhill, B.L., 1966a Changes in deoxyribonucleoprotein during  
Gledhill, M.P., spermiogenesis in the bull.  
Rigler, R., Exptl. Cell Res. 41, 652  
Ringertz, N.R.
- Gledhill, B.L., 1966d Atypical changes of deoxyribonucleoprotein  
Gledhill, M.P., during spermiogenesis associated with a  
Rigler, R., case of infertility in the bull.  
Ringertz, N.R. J. Reprod. Fert. 12, 575
- Goldberg, G.M., 1968 Steroid biosynthetic activity of Leydig cells  
Alleyne, W.M., in dl - ethionine treated rats.  
Maeir, D.M. Federation Proc. 27, 547
- Goldberg, G.M., 1959 Testicular lesions following ingestion of  
Pfau, A., dl - ethionine studied by a quantitative  
Ungar, H. cytologic method  
Am. J. Pathol. 35, 383
- Goldeck, H., 1951 Der Stickstoff - Lost - Einfluß auf die  
Hagenak, H. Fertilität und Spermatogenese der Labora-  
toriumsratte.  
Z. Ges. exp. Med. 117, 467

- Gomes, W.R. 1970 Metabolic and regulatory hormones influencing testis function. The Testis III ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L. Vandemark, Academic Press, N.Y., London, 67
- Grant 1967 Diskussionsbemerkung zu Jirásek
- Grasso, J.A. 1963 Cytochemical studies of nucleic acids and proteins in erythrocytic development  
Woodard, J.W.,  
Swift, H. Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 134
- Gunn, S.A. 1970 Cadmium and other mineral elements.  
Gould, T.C. The Testis III ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L. Vandemark. Academic Press N.Y., London, 377
- Gunn, S.A., 1963 Effect of triethylenemelamine (TEM) on  
Gould, T.C., endocrine system on the male rat.  
Anderson, W.A.D. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 112, 614
- Harrison, R.G. 1956 Factors influencing the process of spermatogenesis in the experimental animal.  
Brit. J. Urol. 28, 422
- Hartmann, C.G., 1950 Vasodilatation of the rat testis in response  
Millman, N., to Human Chorionic Gonadotropin.  
Stavorski, J. Fert. Steril. 1, 443
- Heinke, E. 1960 Klinik der Fertilitätsstörungen beim Manne  
in Handbuch der Haut- und Geschlechts-  
krankheiten Ergänzungswerk VI / 3 Hrsg.:  
H. Schuermann, R. Doepfmer, 115
- Heller, C.G., 1970 The role of FSH, ICSH and endogenous  
Morse, H.C., testosterone during testicular suppression  
Su, M., by exogenous testosterone in normal men.  
Rowley, M.J. Advances in Experimental Medicine and  
Biology, Vol 10, The Human Testis ed.  
E. Rosemberg, M.D., C.A. Paulsen, M.D.,  
249
- Heller, C.G., 1945 Hyalinization of the seminiferous tubules  
Nelson, W.O. associated with normal or failing Leydig -  
cell function. Discussion of relationship to  
eunuchoidism, gynecomastia, elevated  
gonadotrophins, depressed 17 - ketosteroids  
and estrogens.  
J. Clin. Endocrinol. 5, 1
- Hilscher, W. 1967 DNA - synthesis; proliferation and regeneration  
of the spermatogonia in the rat.  
Arch. d' Anat. micr. 56, 75

- Hilscher, B., 1966 Autoradiographische Bestimmung der Generationszeiten und Teilphasen der verschiedenen Spermatogonien - Generationen der Ratte.  
Naturwissenschaften 16, 415
- Hilscher, W., 1968 Histologische und autoradiographische Untersuchungen zu "Prä-spermatogenese" und "Spermatogenese" der Ratte.  
Z. f. Zellforsch. 86, 327
- Hilscher, W., 1968 Untersuchungen am Samenepithel der Ratte nach Gaben von "Endoxan" und "Natulan".  
Beitr. path. Anat. 137, 452
- Hirschmann, W.D. 1969 Straub, O.C. Z. Naturforschung (B) 24, 787
- Hochereau, M.T. 1963 Etude comparée de la vague spermatogénétique chez le taureau et chez le rat.  
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 3, 5
- Hooker, C.W. 1970 The intertubular tissue of the testis.  
The Testis I ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L. Vandemark, Academic Press, N.Y. London, 483
- Horne, H.W. 1948 Paull, D.B., Munroe, D. Fertility studies in the human male with traumatic injuries of the spinal cord and cauda equina.  
New Engl. J. Med. 239, 959
- Howard, R.P. 1950 Sniffen, R.C., Simmon, F.A., Albright, F. Testicular deficiency.  
A clinical and pathologic study.  
J. Clin. Endocr. 10, 121
- Huckins, C. 1971 The spermatogonial stem cell population in adult rats.  
I. Their morphology, proliferation and maturation.  
Anat. Rec. 169, 533
- Hudson, B., 1970 Burger, H.G., de Kretser, D.M., Coghlan, J.P., Taft, H.P. Testosterone plasma levels in normal and pathological conditions.  
Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 10, The Human Testis, ed. E. Rosemberg, M.D., C.A. Paulsen, M.D., 423
- Hundeiker, M. 1970 Untersuchungen über die Vascularisation des Hodens.  
Habilitationsschrift zur Erlangung der venia legendi an der Med. Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen

- Idänpään -  
Heikkilä, P. 1966 Effect of local heat in vivo on the fine structure of the basement membrane and the Sertolicells of the rat testis. *Fert. Steril.* 17, 689
- Inano, H.,  
Tamaoki, B. 1968 Effect of experimental bilateral cryptorchism on testicular enzymes related to androgen formation. *Endocrinology* 83, 1074
- Jackson, H. 1960 Antifertility substances. *The Pharmaceutical J.* 20.2.60., 151
- Jackson, H. 1964 The development of antifertility substances. *Fortschr. Arzneimittelforschung* 7, 134
- Jackson, H.,  
Craig, A.W. 1969 Effects of alkylating chemicals on reproductive cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 160, 215
- Jackson, H.,  
Fox, B.W.,  
Craig, A.W. 1959 The effect of alkylating agents on male rat fertility. *Brit. J. Pharmacol.* 14, 149
- Jailer, J.W. 1938 Mitotic index of hyperplastic interstitial cells of the Guinea Pig *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 39, 281
- Jiráfsek, J.E. 1967 The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. *Ciba Foundation, Colloquia on endocrinology The Testis Vol 16*, 3
- Johnson, S.G. 1970 Investigations into the feed - back mechanism between spermatogenesis and gonadotropin level in man. *Advances in Experimental Medicine and Biology Vol. 10, The Human Testis*, ed. E. Rosenberg, M.D., C.A. Paulsen, M.D., 231
- Jung, S. 1962 Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere. *G. Fischer Verlag Stuttgart*, 242
- Kochar, N.K.  
Harrison, R.G. 1971 The effect of x - rays on the vascularisation of the mouse testis. *Fert. Steril.* 22, 53
- Kuppermann, H.S. 1948 Gonadotrophic hormones and ovarian hyperemia in the rat. *Endocrinology* 43, 275
- Mc Shan, W.H.,  
Meyer, R.K.

- Kurtz, D.F., 1967 Age related differences in the association  
Sinex, F.M. of brain DNA and nuclear protein.  
Biochim. Biophys. Acta 145, 840
- Lawton, J.E. 1970 LH secretory patterns in intact and  
gonadectomized male and female rats.  
Am. J. Physiol. 219, 1019
- Leblond, C.P., 1952 Spermiogenesis of rat, mouse, hamster  
Clermont, Y. and guinea - pig als revealed by the  
"periodic acid-fuchsin sulferous acid"  
technique.  
Am. J. Anat. 90, 167
- Leidl, W., 1969 Individual difference of UV - DNA in sper-  
Stolla, R. matozoa of boars.  
J. Reprod. Fert. 18, 173
- Leuchtenberger, C. 1956 Reduced amounts of desoxyribosenucleic  
Leuchtenberger, R., acid in testicular germ cells of infertile  
Schrader, F., men with active spermatogenesis.  
Weir, D.R. Lab. Invest. 5, 422
- Leuchtenberger, C. 1956 Interferometric dry mass and micro-  
Murmanis, I., spectrophotometric arginine determi-  
Murmanis, L., nations on bull sperm nuclei with normal  
Ito, S., and abnormal DNA content.  
Weir, D.R. Chromosoma 8, 73
- Leuchtenberger, C. 1953 The desoxyribonucleic acid (DNA) content  
Schrader, F., in spermatozoa of fertile and infertile  
Weir, D.R., human males.  
Gentile, D.P. Chromosoma 6, 61
- Levina, S.E. 1970 Possible role of gonocytes in the morpho-  
genesis and secretion of the testis in  
early rat development.  
Morph. Aspects of Andrology 1, 50
- Limanowski, A. 1970 Influence of testosterone on the testes  
of male rats.  
Endokr. Pol. 21, 313
- Lipsett, M.B., 1965 Testosterone production in chromatine -  
Davis, T.E., positive Klinefelter's syndrome.  
Wilson, H., J. clin. Endocr. 15, 1027  
Canfield, C.J.
- Lostroh, A.J. 1963 Effect of follicle - stimulating hormone  
and interstitial cell - stimulating hormone  
on spermatogenesis in Long - Evans rat  
hypophysectomized for six months.  
Acta endocr. 43, 592

- |                                                       |      |                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lynch, K.M.<br>Scott, W.W.                            | 1951 | Lipid distribution in the Sertoli cell and Leydig cell of the rat testis as related to experimental alterations of the pituitary - gonad system.<br>Endocrinology 49, 8                                        |
| Marks, P.A.,<br>Burka, E.R.,<br>Schlesinger, D.       | 1962 | Protein synthesis in erythroid cells, I. Reticulocyte ribosomes active in stimulating amino acid incorporation.<br>Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 2163                                                              |
| Mazzanti, L.,<br>Lopez, M.,<br>Berti, M.G.            | 1964 | Selective destruction in testes induced by fluoroacetamide.<br>Exper. 20, 492                                                                                                                                  |
| Mc Cullagh, E.P.,<br>Schaffenburg, C.A.               | 1952 | The role of the seminiferous tubules in the production of hormones.<br>Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 674                                                                                                            |
| Meyhöfer, W.                                          | 1960 | Untersuchungen an menschlichen Hodenzellen mittels Ultraviolett - Spektrometrie.<br>Beilageheft Z. z. Geburtsh. 157, 162                                                                                       |
| Meyhöfer, W.                                          | 1961 | Über ultraviolett - mikroskopische Untersuchungen an Spermatozoen unter besonderer Berücksichtigung der quantitativen Nucleinsäurebestimmung an der Einzelzelle.<br>Arch. kl. exp. Derm. 213, 761              |
| Meyhöfer, W.                                          | 1963 | Mikrospektrometrische Messungen des Nucleinsäuregehaltes von Spermien fertiler und infertiler Männer.<br>Arch. kl. exp. Derm. 216, 556                                                                         |
| Meyhöfer, W.                                          | 1967 | Ejakulatsuntersuchungen während der Methotrexattherapie unter Berücksichtigung cytophotometrischer Befunde des DNS - und Protein - Gehaltes menschlicher Spermatozoen.<br>1. Europ. Sterilitätskongreß Venedig |
| Meyhöfer, W.                                          | 1970 | Europ. Kolloquium über Zytogenetik in Veterinärmedizin und Säugetierkunde<br>Gießen / Lahn, Okt. 70                                                                                                            |
| Mietkiewski, K.,<br>Warchol, J.B.,<br>Trojanowicz, R. | 1968 | Über den Einfluß von Trenimon auf einige histochemische Reaktionen am Rattenhoden.<br>Acta histochem. 31, 188                                                                                                  |
| Monesi, V.,<br>M.D.                                   | 1962 | Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine.<br>J. Cell Biol. 14, 1                                                |

- Monesi, V. 1964 Ribonucleic acid synthesis during meiosis in the mouse testis.  
J. Cell Biol. 22, 521
- Monesi, V. 1965 Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse: RNA and protein.  
Exptl. Cell Res. 39, 197
- Monesi, V. 1967 Ribonucleic acid and protein synthesis during differentiation of male germ cells in the mouse.  
Arch. d' Anat. microsc. Tome 56, Suppl. au n<sup>o</sup> 3-4, 61
- Monesi, V.,  
Salfi, zit. nach  
Monesi 1967 Arch. d' Anat. microsc. Tome 56,  
Suppl. au n<sup>o</sup> 3-4, 61
- Müller, J. 1957 Kanälchen - und Capillararchitektonik des Rattenhodens.  
Z. f. Zellforsch. 45, 522
- Neumann, F.,  
von Berswordt-  
Wallrabe, R.,  
Elger, W.,  
Steinbeck, H. 1967 Hormonhemmer - Untersuchungen mit  
Testosteron - Antagonisten in: 18. Coll.  
d. Gesellsch. f. Physiol. Chemie,  
Mosbach: Wirkungsmechanismen der Hor-  
mone, P. Karlson (Hrsg.), Springer, 218
- Neumann, F.,  
von Berswordt-  
Wallrabe, R.,  
Elger, W.,  
Steinbeck, H. 1970 Experimentelle Grundlagen und klinische  
Anwendungsmöglichkeiten von Anti-  
androgenen.  
Verhandl. d. dtsh. Ges. f. Innere Med. 76.  
Kongreß, 1176
- Nieschlag, E.,  
Overzier, C. 1970 Überprüfung der inkretorischen Hodenfunk-  
tion mit Bestimmung von Plasmatestosteron  
durch kompetitive Proteinbindung vor und  
nach Stimulation durch HCG.  
Verhandl. d. dtsh. Ges. f. Innere Med.  
76. Kongreß, 876
- Noeske, K.,  
Ebner, H. 1965 Zum Problem der Hyperchromasie.  
Verhandl. d. dtsh. Ges. f. Pathologie  
49. Tagung Saarbrücken 6.-9.6.65.  
G. Fischer Verlag Stuttgart
- Oakberg, E.F. 1956a A description of spermatogenesis in the  
mouse and its use in the analysis of the  
cycle of the seminiferous epithelium and  
the germ cell renewal.  
Am. J. Anat. 99, 391

- Oakberg, E.F. 1956b Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium.  
Am. J. Anat. 99, 507
- Oakberg, E.F. 1971 Spermatogonial stem - cell renewal in the mouse.  
Anat. Rec. 169, 515
- Parez, M., 1960 Sur la teneur en acide desoxyribonucléique  
Petel, J.P., des spermatoïdes de taureaux presentants  
Vendrel, C. différents degrés de fécondité.  
Compt. Rend. 251, 2581
- Partington, M., 1964 Comparative action of some methane  
Fox, B.W., sulfonic esters on the cell population  
Jackson, H. of the rat testis.  
Exptl. Cell. Res. 33, 78
- Perey, B., 1961 The wave of the seminiferous epithelium  
Clermont, Y., in the rat.  
Leblond, C.P. Am. J. Anat. 108, 47
- Petry, R., 1970 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus  
Rausch-Stroomann, J.G., der Antiandrogene Cyproteron und Cypro-  
Berthold, K., teronacetat beim Menschen (Gonadotropin-,  
Mauss, J., Plasmatestosteron-, und morphologische  
Ai, M., Keimdrüsenuntersuchungen).  
Vermeulen, A. Verhandl. d. dtsh. Ges. f. Innere Med.  
76. Kongreß, 873
- Pierce, G.B., 1968 Synthesis of basement membranes by  
Nakane, P.K. epithelial cells.  
A response to injury.  
Fed. Proc. 27, 411
- Pierce, G.B., 1969 Basement membranes. Synthesis and  
Nakane, P.K. deposition in response to cellular injury.  
Lab. Invest. 21, 27
- Pomerantseva, 1969 (Mutagene Wirkung von Bestrahlung auf  
M.D. Spermatogonien der Maus)  
Ramaja, L.K. Dohl. Akad. Nauh. SSSR 185, 1157
- Richards, B.M., 1970 The molecular structure of nucleohistone  
Pardon, J.F. (DNH).  
Exptl. Cell Res. 62, 184
- Ringertz, N.R., 1970 Changes in deoxyribonucleoprotein during  
Gledhill, B.L., spermiogenesis in the bull.  
Darzynkiewicz, Z. Exptl. Cell Res. 62, 204

- |                                  |       |                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Röhrborn, G.                     | 1964  | Mutagene Wirkung von alkylierenden Substanzen.<br>Chemotherapie maligner Tumoren,<br>ed. H. Williams (3. Bielefelder Symposion)                                     |
| Röhrborn, G.                     | 1965a | Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen.<br>Humangenetik 1, 205                                                                       |
| Röhrborn, G.                     | 1965b | Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus.<br>Humangenetik 1, 576                                                                                   |
| de Rooij, D.G.                   | 1970  | Some observations on the A <sub>O</sub> - Spermatogonia of the mouse.<br>Morphol. Aspects of Andrology 1, 13                                                        |
| de Rooij, D.G.,<br>Kramer, M.F.  | 1968a | Spermatogonial stem - cell renewal in rats and mice.<br>Z. f. Zellforschung 85, 206                                                                                 |
| de Rooij, D.G.,<br>Kramer, M.F.  | 1968b | Spermatogonial stem - cell renewal in the rat, mouse and golden hamster. A study with the alkylating agent Myleran.<br>Z. f. Zellforschung 92, 400                  |
| Rutishauser, A.,<br>Bollag, W.   | 1963  | Cytological investigations with a new class of cytotoxic agents: methylhydrazine derivatives.<br>Exper. 19, 131                                                     |
| Schoen, E.J.,<br>Samuels, L.T.   | 1965  | Testicular androgen biosynthesis following corticotrophin and human chorionic gonadotrophin administration.<br>Acta Endocrinol. 50, 365                             |
| Setchell, B.P.                   | 1970  | Testicular blood supply, lymphatic drainage, and secretion of fluid.<br>The Testis I, ed. A.D. Johnson, W.R. Gomes, N.L. Vandemark, Academic Press N.Y. London, 101 |
| Setchell, B.P.,<br>Linzell, J.L. | 1968  | The effect of some drugs, hormones and physiological factors on the flow of rete testis fluid in the ram.<br>J. Reprod. Fertil. 16, 320                             |
| Sibatani, A.                     | 1953  | Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of desoxypentose nucleic acid.<br>III. Effects of histone on the Feulgen reaction in vitro.<br>J. Biochem. 40, 119  |

- Simpson, M.E., 1944 Sensitivity of the reproductive system of  
Li, C.H., hypophysectomized 40 day male rats to  
Evans, H.M. gonadotropic substances.  
Endocrinology 35, 96
- Sirlin, J.L., 1957 Nature, Lond. 179, 725  
Edwards, R.G.
- Steinberger, E., 1959 A radiomimetic effect of triethylenemel-  
Nelson, W.O., amine on reproduction in the male rat.  
Boccabella, A., Endocrinology 65, 40  
Dixon, W.J.
- Steinberger, E., 1966 Pituitary "total" gonadotropins, FSH and  
Duckett, G.E. LH in orchidectomized or cryptorchid  
rats.  
Endocrinology 79, 912
- Steinberger, E., 1967 Microscopy, cytochemistry and steroid  
Steinberger, A., biosynthetic activity of Leydig cells in  
Vilar, O., culture.  
Salamon, I.I., Ciba Foundation, Colloquia on Endocrinology,  
Sud, B.N. Vol 16, The Testis, 56
- Tamaoki, B., 1969 In vitro synthesis and conversion of andro-  
Inano, H., gens in testicular tissue.  
Nakano, H. The Gonads, K.W. Mc Kerns, North Holland  
Publ. Comp. Amsterdam, 547
- Tamm, J. 1970b Intersexualität  
in Klinische Pathophysiologie, W. Siegenthaler  
(Hrsg.) Thieme Verlag Stuttgart, 384
- Thiery, M. 1963 Het experimentele carcinoma colli uteri.  
Arscia Uitgaven N.V. Brussel, Presses  
Academiques Europ. S.C., 43
- Van Demark, N.L. 1970 Temperature effects.  
Free, M.J. The Testis III, ed. A.D. Johnson, W.R.  
Gomes, N.L. Van Demark, Academic  
Press N.Y. London, 233
- Vaughn, J.C. 1966 The relationship of the "spere chromato-  
phile" to the fate of displaced histones  
following transition in the rat spermiogenesis.  
J. Cell Biol. 31, 257
- Waites, G.M.H., 1969 Some physiological aspects of the function  
Setchell, B.P. of the testis.  
The Gonads, K.W. Mc Kerns, North Holland  
Publ. Comp. Amsterdam, 649

- Weitzel, G., 1964  
 Schneider, F.,  
 Fretzdorf, A. M. Exper. 20, 38
- Weitzel, G., 1967a  
 Schneider, F.,  
 Fretzdorf, A. M.,  
 Durst, J.,  
 Hirschmann, W. D. Hoppe - Seyler's Z. 348, 433
- Weitzel, G., 1967  
 Schneider, F.,  
 Hirschmann, W. D.,  
 Durst, J.,  
 Thauer, R.,  
 Ochs, H.,  
 Kummer, D. Hoppe - Seyler's Z. 348, 443
- Weitzel, G., 1968  
 Schneider, F.,  
 Kummer, D.,  
 Ochs, H. Z. Krebsforschung 70, 354
- Wetterer, E. 1967 Bau und Funktion des Gefäßsystems.  
 in Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie,  
 Hrsg. W. D. Keidel, Thieme Verlag  
 Stuttgart, 96
- Wurtman, R. J. 1964 An effect of luteinizing hormone on the  
 fractional perfusion of the rat ovary.  
 Endocrinology 75, 927
- Yamamoto, M., 1970 Radioimmunoassay of serum and pituitary  
 LH and FSH levels in intact male rats  
 Diebel, N. D., and of serum and pituitary LH in castrated  
 Bogdanove, E. M. rats of both sexes - apparent absence of  
 diurnal rhythmus.  
 Endocrinology 87, 798
- Ying, B. P., 1965 Testicular sterols, III. Effect of gonadotro-  
 Chang, Y. J., phins on the biosynthesis of testicular  
 Gaylor, J. L. sterols.  
 Biochim. Biophys. Acta 100, 256
- Zeller, P., 1963  
 Gutmann, H.,  
 Hagedus, B.,  
 Kaiser, A.,  
 Langemann, A.,  
 Müller, M. Exper. 19, 129

Wir danken Herrn Prof. Meyhöfer für das Thema dieser Arbeit, Herrn Dr. Bosse für seine Unterstützung beim Versuchsaufbau und die Einführung in die Thematik und Frau Peters für die Färbung der Präparate.

Die statistische Auswertung erfolgte im Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation (Leiter Prof. Dudeck) unter Beratung von Dipl.-Math. W. Höbel, dem dafür unser Dank gilt.

## Lebenslauf

Name: Heese, Klaus Dieter

Geburtstag: 19. Oktober 1944

Geburtsort: Bad Wildungen

Eltern: Werner Heese  
Maria Heese, geb. Pothmann

Beruf des Vaters: kaufm. Angestellter

Schulbesuch: 1. Volksschule Besse  
Ostern 1951 - Ostern 1955  
2. Mittelschule Gudensberg  
Ostern 1955 - Ostern 1956  
3. Albert-Schweitzer-Schule Kassel  
Ostern 1956 - Ostern 1966  
Abitur: 11. Februar 1966

Bundeswehr: verkürzter Grundwehrdienst  
April 1966 - März 1967

Universität: Studium der Medizin  
an der Justus Liebig-Universität Gießen  
Sommersemester 1967 - Sommersemester 1972  
Vorphysikum: 1. April 1968  
Physikum: 8. Oktober 1969  
Staatsexamen: 11. Januar 1973

Heirat: am 26. Juli 1968  
mit Ingrid Butzkies

## Lebenslauf

Name: Dietrich Strödter

Geburtstag: 8.9.1944 als sechstes von sieben Kindern

Geburtsort: Kattowitz

Eltern: Hermann Karl Strödter;  
Liselotte, geb. Dallmeyer

Beruf des Vaters: Jurist, 1946 gest.

Schulbesuch: 1. Ostern 1951 - 1956  
Grundschule in Alt-Wallmoden  
2. 1956 - 1966 Gymnasium in Salzgitter-Bad;  
Abitur am 22.2.1966

Grundwehrdienst: April 1966 - März 1967

Universität: Studium der Medizin an der Justus Liebig-  
Universität Gießen  
von Sommersemester 1967 bis Sommersemester 1972;  
Vorphysikum am 2.4.1968  
Physikum am 8.10.1969  
Staatsexamen am 11.1.1973

Heirat: am 16.10.1970 mit der Lehrerin Helga Jäger

## Lebenslauf

Name: Schreck, Karl-Rainer

Geburtstag: 21. Dezember 1947

Geburtsort: Heidelberg

Eltern: Prof. Dr. Karl Schreck  
Maria-Magdalena Schreck, geb. Keller

Beruf des Vaters: Bundesbahn-Abteilungspräsident

Schulbesuch: Textorschule in Frankfurt/M.  
von Ostern 1954 - Ostern 1958  
Lessing-Gymnasium in Frankfurt/M.  
von Ostern 1958 bis Herbst 1966  
Abitur am 3. November 1966

Universität: Studium der Medizin an der  
Justus Liebig-Universität Gießen  
vom Sommersemester 1967 bis Sommersemester 1972  
Vorphysikum: 2. April 1968  
Physikum: 8. Oktober 1969  
Staatsexamen: 11. Januar 1973







